

NEI MOREIRA

**REPRODUÇÃO E ESTRESSE EM FÊMEAS DE
FELÍDEOS DO GÊNERO *Leopardus***

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de
Doutor em Ciências, área de concentração Zoologia, pelo
Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Emygdio Leite de Araujo Monteiro Filho

CURITIBA

2001

NEI MOREIRA

**REPRODUÇÃO E ESTRESSE EM FÊMEAS DE
FELÍDEOS DO GÊNERO *Leopardus***

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de
Doutor em Ciências, área de concentração Zoologia, pelo
Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Emygdio Leite de Araujo Monteiro Filho

CURITIBA

2001

TERMO DE APROVAÇÃO

REPRODUÇÃO E ESTRESSE EM FÊMEAS DE FELÍDEOS DO GÊNERO

Leopardus

por

Nei Moreira

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências, área de concentração Zoologia no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná., pela Comissão formada pelos professores:

Prof. Dr. Emygdio Leite de Araujo Monteiro Filho - UFPR

Prof. Dr. Augusto Shinya Abe - UNESP

Prof. Dr. José Ricardo Pachaly - UNIPAR

Prof^a. Dra. Clotilde de Lourdes Branco Germiniani - UFPR

Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss - UFPR

*Esta tese é dedicada a minha família, pelo
constante amor e apoio.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Emygdio Leite de Araujo Monteiro Filho, pela amizade e precisa orientação.

À Itaipu Binacional, pelo apoio recebido para a realização deste trabalho.

À Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, pelo auxílio financeiro para viagem ao *Smithsonian Institution - Conservation and Research Center*, com o objetivo de processar as amostras desta tese.

Ao Médico Veterinário Wanderlei de Moraes, do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional, pelo companheirismo e dedicação profissional.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Zoologia, pelo apoio recebido.

À Vera Maria Adélio, Secretária do Curso de Pós-Graduação em Zoologia, pelo profissionalismo e simpatia.

Ao Médico Veterinário William F. Swanson, do *Center for Research in Endangered Species, Cincinnati Zoo and Botanical Garden*, Cincinnati, Ohio, EUA; pela constante disposição na transmissão de conhecimentos no campo da fisiologia da reprodução em felídeos.

Ao técnico agrícola Marcos José de Oliveira, do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional, o qual, sem seu apoio e auxílio, não teria sido possível realizar este trabalho.

À Janine L. Brown, do *Conservation and Research Center, National Zoological Park, Smithsonian Institution*, Front Royal, Virginia, EUA; Laura H. Graham, do *Conservation Station, Disney's Animal Kingdom, Lake Buena Vista*, Florida, EUA; e Astrid Bellem, na época do *Conservation and Research Center*; pela orientação e assistência técnica na realização das dosagens hormonais fecais.

A Roberto Rochadelli, James Joseph Roper e Carla Amorim, pela orientação na análise estatística.

À bibliotecária Luciana Benevenuto Barduzzi, da UFPR – Campus Palotina, pela dedicação e apoio na correção desta tese.

À Empresa Nuvital Nutrientes Ltda., pelo fornecimento do suplemento mineral e vitamínico.

À CAPES/CNPq e *Friends of the National Zoo*, pelo patrocínio de recursos, material e infraestrutura.

À Empresa *British Airways*, pelo fornecimento das passagens aéreas para o processamento da primeira etapa de amostras.

À Farmacêutica Bioquímica Leonilda Correia dos Santos, do Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional, pelo exemplo de entusiasmo e amor à pesquisa.

Aos funcionários do Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional, pela amizade e apoio constantes.

Aos tratadores e pessoas responsáveis pela manutenção do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional e do Zoológico de Curitiba, pelo apoio, auxílio e trabalho fundamental.

Ao Dr. S. K. Wasser (*University of Seattle, WA*) pelo fornecimento do anticorpo para estradiol.

Ao Dr. J. F. Roser (*University of California, Davis*) pelo anticorpo para progesterona.

À Universidade Federal do Paraná, por ter propiciado condições para a realização desta tese.

A todos os amigos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Finalmente, agradeço a Deus, por dar à minha vida a sua direção.

"Serious attempts to preserve biological species must deal with the vexing question of preserving not just the species but its pristine range of behaviors" (May & Lyles, 1987)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	18
RESUMO GERAL	20
ABSTRACT	21
I. PREFÁCIO GERAL	22
REFERÊNCIAS	30
II. CAPÍTULOS	33
1. COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS FECAIS SECAS E ÚMIDAS PARA ANÁLISE POR RADIOIMUNOENSAIO DE ESTERÓIDES EM FELÍDEOS DO GÊNERO <i>LEOPARDUS</i>	34
RESUMO	34
ABSTRACT	36
INTRODUÇÃO	37
MATERIAL E MÉTODOS	39
RESULTADOS	47
DISCUSSÃO	66
CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68
2. HORMÔNIOS ESTERÓIDES REPRODUTIVOS E ATIVIDADE OVARIANA EM FELÍDEOS DO GÊNERO <i>LEOPARDUS</i>	69
RESUMO	69
ABSTRACT	71
INTRODUÇÃO	72
MÉTODOS	73
RESULTADOS	83
DISCUSSÃO	115
CONCLUSÕES	119
REFERÊNCIAS	120
3. VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE ENZIMOIMUNOENSAIO (EIA) PARA DETERMINAÇÃO DE ESTRÓGENO EM FEZES DE PEQUENOS FELÍDEOS	124
RESUMO	124
ABSTRACT	126
INTRODUÇÃO	127
MATERIAL E MÉTODOS	128

RESULTADOS	136
DISCUSSÃO	137
CONCLUSÕES	138
REFERÊNCIAS	139
4. EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE CATIVEIRO NOS ASPECTOS REPRODUTIVOS E ADRENOCORTICAIS EM FÊMEAS DE GATO-DO-MATO-PEQUENO (<i>LEOPARDUS TIGRINUS</i>) E GATO-MARACAJÁ (<i>LEOPARDUS WIEDII</i>)	140
RESUMO	140
ABSTRACT	142
INTRODUÇÃO	144
MATERIAL E MÉTODOS	156
RESULTADOS	166
DISCUSSÃO	179
CONCLUSÕES	185
REFERÊNCIAS	186
5. PROGESTÁGENOS, ESTRÓGENOS E CORTICÓIDES FECALIS DURANTE A GESTAÇÃO, O PARTO E O PÓS-PARTO EM GATO-DO-MATO-PEQUENO (<i>LEOPARDUS TIGRINUS</i>) E GATO-MARACAJÁ (<i>LEOPARDUS WIEDII</i>)	192
RESUMO	192
ABSTRACT	193
INTRODUÇÃO	194
MATERIAL E MÉTODOS	196
RESULTADOS	198
DISCUSSÃO	201
CONCLUSÕES	203
REFERÊNCIAS	204
6. REPRODUÇÃO EM FÊMEAS DE PEQUENOS FELÍDEOS SUL-AMERICANOS	205
INTRODUÇÃO	205
CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS GERAIS	206
SUGESTÕES PARA O MANEJO REPRODUTIVO (CONSTRUÇÃO DOS RECINTOS E ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL, PROTOCOLO PARA REPRODUÇÃO)	212
AValiação REPRODUTIVA	216
REPRODUÇÃO ASSISTIDA	216
CONTRACEPÇÃO	218
REFERÊNCIAS	219
III. ANEXOS	225



LISTA DE TABELAS

I. PREFÁCIO GERAL

TABELA 1. Médias de natalidade, mortalidade geral e mortalidade neonatal para as três espécies do gênero <i>Leopardus</i> , considerando os anos de 1996 a 2000, segundo dados do Censo de Animais Cativos da Sociedade de Zoológicos do Brasil (SZB).....	26
--	----

II. CAPÍTULOS

1. Comparação entre amostras fecais secas e úmidas para análise por radioimunoensaio de esteróides em fêmeas de felídeos do gênero *Leopardus*

TABELA 1. Coeficientes de correlação entre amostras secas e úmidas, para estrógeno e progestágeno.....	47
--	----

TABELA 2. Coeficientes de correlação entre amostras secas e úmidas, para estrógeno e progestágeno, por espécie.....	65
---	----

2. Hormônios esteróides reprodutivos e atividade ovariana em felídeos do gênero *Leopardus*

TABELA 1. Informação geral sobre as fêmeas de gato-do-mato-pequeno, jaguatirica e gato-maracajá utilizadas nesse estudo.	74
---	----

TABELA 2. Número e tamanho (média \pm SEM) dos folículos ovarianos e CL e diâmetro uterino em fêmeas de jaguatirica, gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá durante os exames laparoscópicos conduzidos em setembro e abril	89
---	----

TABELA 3. Linha basal média (média \pm SEM) e concentrações pico de estrógenos fecais e metabólitos de progestágeno, por fêmea, para jaguatirica, gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá em amostras coletadas durante 14 a 18 meses	91
--	----

TABELA 4. Características individuais dos esfregaços vaginais colhidos de fêmeas de gato-do-mato-pequeno, jaguatirica e gato-maracajá, durante os exames laparoscópicos realizados no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional em setembro e abril.....	92
---	----

TABELA 5. Duração do estudo e médias de excreção de estrógeno e progestágenos (média \pm SEM) para cada fêmea.....	93
--	----



TABELA 6. Valores dos coeficientes de correlação entre as concentrações de estrógeno e os dados meteorológicos para cada fêmea utilizada no experimento 111

TABELA 7. Valores dos coeficientes de correlação entre as concentrações de progestágenos e os dados meteorológicos para cada fêmea utilizada no experimento 112

3. Validação de um método de enzimoimunoensaio (EIA) para determinação de estrógeno em fezes de pequenos felídeos

4. Efeitos das condições de cativeiro nos aspectos reprodutivos e corticóides fecais em fêmeas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e gato-maracajá (*Leopardus wiedii*)

TABELA 1. Informação geral sobre as fêmeas de gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá utilizadas neste estudo 156

5. Progestágenos, estrógeno e corticóides fecais durante gestação, parto e pós-parto em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e gato-maracajá (*Leopardus wiedii*)

TABELA 1. Informação geral sobre as fêmeas de gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá utilizadas nesse estudo 196

6. Reprodução em fêmeas de pequenos felídeos neotropicais

TABELA 1. Dados reprodutivos para pequenos felídeos sul-americanos 207

TABELA 2. Intervalos e variações entre picos de excreção de estrógeno para fêmeas de gato-do-mato-pequeno, jaguatirica e gato-maracajá 210



LISTA DE FIGURAS

I. PREFÁCIO GERAL

Fig. 1. População de felídeos neotropicais em cativeiro no Brasil em 2000 (Fonte: SZB)...	24
Fig. 2. Número total de animais das três espécies em cativeiro no Brasil, para os anos de 1996 a 2000.	25
Fig. 3. Censo de felídeos do gênero <i>Leopardus</i> em cativeiro no Brasil em 1998.	27
Fig. 4. Censo de felídeos do gênero <i>Leopardus</i> em cativeiro no Brasil em 2000 (Fonte: Censo 2000 SZB).	28

II. CAPÍTULOS

1. Comparação entre amostras fecais secas e úmidas para análise por radioimunoensaio de esteróides em fêmeas de felídeos do gênero *Leopardus*

Fig. 1. Perfis da excreção fecal de estrógeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de jaguatirica (<i>Leopardus pardalis</i>)	48
Fig. 2. Perfis da excreção fecal de estrógeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de jaguatirica (<i>Leopardus pardalis</i>)	49
Fig. 3. Perfis da excreção fecal de estrógeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de jaguatirica (<i>Leopardus pardalis</i>)	50
Fig. 4. Perfis da excreção fecal de estrógeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de jaguatirica (<i>Leopardus pardalis</i>)	51
Fig. 5. Perfis da excreção fecal de estrógeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de gato-do-mato-pequeno (<i>Leopardus tigrinus</i>)	52
Fig. 6. Perfis da excreção fecal de estrógeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de gato-do-mato-pequeno (<i>Leopardus tigrinus</i>)	53



Fig. 7. Perfis da excreção fecal de estrógeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de gato-maracajá (<i>Leopardus wiedii</i>).....	54
Fig. 8. Perfis da excreção fecal de estrógeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de gato-maracajá (<i>Leopardus wiedii</i>)	55
Fig. 9. Perfis da excreção fecal de progestágeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de jaguatirica (<i>Leopardus pardalis</i>)	57
Fig. 10. Perfis da excreção fecal de progestágeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de jaguatirica (<i>Leopardus pardalis</i>)	58
Fig. 11. Perfis da excreção fecal de progestágeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de jaguatirica (<i>Leopardus pardalis</i>)	59
Fig. 12. Perfis da excreção fecal de progestágeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de jaguatirica (<i>Leopardus pardalis</i>)	60
Fig. 13. Perfis da excreção fecal de progestágeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de gato-do-mato-pequeno (<i>Leopardus tigrinus</i>).....	61
Fig. 14. Perfis da excreção fecal de progestágeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de gato-do-mato-pequeno (<i>Leopardus tigrinus</i>).....	62
Fig. 15. Perfis da excreção fecal de progestágeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de gato-maracajá (<i>Leopardus wiedii</i>).....	63
Fig. 16. Perfis da excreção fecal de progestágeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de gato-maracajá (<i>Leopardus wiedii</i>).....	64



2. Hormônios reprodutivos esteróides e atividade ovariana em felídeos do gênero *Leopardus*

Fig. 1. Laparoscopia em fêmea de felídeo silvestre, realizada no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional	76
Fig. 2. Exame e mensuração de útero e ovários, com auxílio da agulha de Verres, durante laparoscopia em felídeo silvestre; realizada no CASIB	76
Fig. 3. Ovário e ápice do corno uterino de jaguatirica, visualizados através do laparoscópio	77
Fig. 4. Colheita de material para esfregaço vaginal em fêmea de gato-do-mato-pequeno (<i>Leopardus tigrinus</i>), no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional.	78
Fig. 5. Contador β utilizado para dosagem de estradiol por radioimunoensaio	80
Fig. 6. Perfis da excreção fecal de estrógeno (triângulos vazios) e progestágeno (círculos preenchidos) em fêmeas de jaguatirica alojadas individualmente no Criadouro da Itaipu Binacional (jaguatiricas 1 e 2) e no Zoológico de Curitiba (jaguatirica 3). As setas indicam o momento da laparoscopia. Note as diferenças do eixo y nos valores máximos de estrógenos fecais entre indivíduos	85
Fig. 7. Perfis da excreção fecal de estrógeno (triângulos vazios) e progestágeno (círculos preenchidos) em fêmeas adultas de gato-do-mato-pequeno alojadas individualmente no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional. As setas indicam o momento da laparoscopia.....	86
Fig. 8. Perfis da excreção fecal de estrógeno (triângulos vazios) e progestágeno (círculos preenchidos) em fêmeas adultas de gato-maracajá alojadas individualmente no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (gata-maracajá 1) e no Zoológico de Curitiba (gata-maracajá 2). As setas indicam o momento da laparoscopia	87
Fig. 9. Perfis de estrógeno fecal (triângulos vazios) e da excreção de metabólitos de progestágeno (círculos preenchidos) em fêmeas de jaguatirica, gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá durante um período de 4,5 meses, mostrando a ciclicidade ovariana (jaguatirica e gato-do-mato-pequeno) e ovulações espontâneas sucessivas (gato-maracajá) em maior detalhe	88
Fig. 10. Concentrações médias de estrógenos fecais em felídeos do gênero <i>Leopardus</i>	94
Fig. 11. Concentrações médias de estrógenos fecais em felídeos do gênero <i>Leopardus</i> , sem considerar a fêmea de gato-do-mato-pequeno 2.....	95



Fig. 12. Concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para as jaguatiricas.....	96
Fig. 13. Representação gráfica da análise estatística (teste de Tukey-Kramer HSD) das concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para as jaguatiricas. Em verde estão representados os losangos das médias. Os losangos das médias são uma representação esquemática da média e do erro padrão da média para cada grupo de amostras. A linha através de cada losango representa a média do grupo. A altura de cada losango representa o intervalo de confiança de 95% para cada grupo e a largura do losango representa o tamanho da amostra do grupo	97
Fig. 14. Concentrações logarítmicas médias de estrógeno segundo a estação do ano, para a fêmea jaguatirica 1	98
Fig. 15. Representação gráfica da análise estatística (teste de Tukey-Kramer HSD) das concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para a fêmea jaguatirica 1	99
Fig. 16. Concentrações logarítmicas médias de estrógeno segundo a estação do ano, para a fêmea jaguatirica 2	100
Fig. 17. Representação gráfica da análise estatística (teste de Tukey-Kramer HSD) das concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para a fêmea jaguatirica 2	101
Fig. 18. Concentrações logarítmicas médias de estrógeno segundo a estação do ano, para a fêmea jaguatirica 3	102
Fig. 19. Representação gráfica da análise estatística (teste de Tukey-Kramer HSD) das concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para a fêmea jaguatirica 3	103
Fig. 20. Concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para as gatas-maracajá	104
Fig. 21. Representação gráfica da análise estatística (teste de Tukey-Kramer HSD) das concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para as gatas-maracajá.....	105
Fig. 22. Concentrações logarítmicas médias de estrógeno segundo a estação do ano, para a gata-maracajá 1	106



Fig. 23. Representação gráfica da análise estatística (teste de Tukey-Kramer HSD) das concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para a gata-maracajá 1.....	107
Fig. 24. Concentrações logarítmicas médias de estrógeno segundo a estação do ano, para a gata-maracajá 2.....	108
Fig. 25. Representação gráfica da análise estatística (teste de Tukey-Kramer HSD) das concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para a gata-maracajá 2.....	109
Fig. 26. Variação mensal média de umidade relativa (círculos preenchidos) e temperatura (triângulos vazios) do ar durante os anos do experimento (Fonte: Estação Meteorológica da Itaipu Binacional)	110
Fig. 27. Variação mensal média de radiação (quadrados vazios) e duração solar (círculos preenchidos) durante os anos do experimento (Fonte: Estação Meteorológica da Itaipu Binacional)	110
Fig. 28. Concentrações logarítmicas médias de progestágenos em felídeos do gênero <i>Leopardus</i>	113
Fig. 29. Representação gráfica da análise estatística (teste de Tukey-Kramer HSD) das concentrações logarítmicas médias de progestágenos, por espécie.....	113

3. Validação de um método de enzimoimunoensaio (EIA) para determinação de estrógeno em fezes de pequenos felídeos

Fig. 1. Hospital veterinário do <i>Conservation and Research Center – Smithsonian Institution</i> , onde estão localizados os laboratórios de reprodução.....	129
Fig. 2. Princípio do enzimoimunoensaio (EIA) utilizado.....	130
Fig. 3. Perfis da excreção fecal de estrógeno em fêmea adulta de gato-do-mato-pequeno (<i>Leopardus tigrinus</i>), segundo os métodos de enzimoimunoensaio (EIA, círculos preenchidos) e radioimunoensaio (RIA, triângulos vazios)	136

4. Efeitos das condições de cativeiro nos aspectos reprodutivos e corticóides fecais em fêmeas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e gato-maracajá (*Leopardus wiedii*)

Fig. 1. Recintos utilizados durante a primeira fase do experimento para gato-maracajá (recinto mais alto)	163
---	-----



Fig. 2. Recintos utilizados durante a primeira fase do experimento para gato-do-mato-pequeno	164
Fig. 3. Recintos utilizados durante a segunda fase do experimento para gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá.....	165
Fig. 4. Perfis da excreção fecal de estrógeno (quadrados vazios), progestágeno (círculos preenchidos) e corticóides (losangos preenchidos) em fêmea adulta de gato-do-mato-pequeno (<i>Leopardus tigrinus</i>). A letra M representa mudança de recinto e a letra E enriquecimento ambiental	167
Fig. 5. Perfis da excreção fecal de estrógeno (quadrados vazios), progestágeno (círculos preenchidos) e corticóides (losangos preenchidos) em fêmea adulta de gato-do-mato-pequeno (<i>Leopardus tigrinus</i>). A letra M representa mudança de recinto, a letra E enriquecimento ambiental e a letra P perda de pelo	168
Fig. 6. Perfis da excreção fecal de estrógeno (quadrados vazios), progestágeno (círculos preenchidos) e corticóides (losangos preenchidos) em fêmea adulta de gato-do-mato-pequeno (<i>Leopardus tigrinus</i>). A letra M representa mudança de recinto e a letra E enriquecimento ambiental	169
Fig. 7. Perfis da excreção fecal de estrógeno (quadrados vazios), progestágeno (círculos preenchidos) e corticóides (losangos preenchidos) em fêmea adulta de gato-maracajá (<i>Leopardus wiedii</i>). A letra M representa mudança de recinto e a letra E enriquecimento ambiental	170
Fig. 8. Perfis da excreção fecal de estrógeno (quadrados vazios), progestágeno (círculos preenchidos) e corticóides (losangos preenchidos) em fêmea adulta de gato-maracajá (<i>Leopardus wiedii</i>). A letra M representa mudança de recinto e a letra E enriquecimento ambiental	171
Fig. 9. Gráfico da análise de variância "oneway" de log estrógenos fecais, durante as três fases do estudo, para fêmeas de gato-do-mato-pequeno	175
Fig. 10. Gráfico da análise de variância "oneway" de log corticóides fecais, durante as três fases do estudo, para fêmeas de gato-do-mato-pequeno	176
Fig. 11. Gráfico da análise de variância "oneway" de log estrógenos fecais, durante as três fases do estudo, para fêmeas de gato-maracajá	177
Fig. 12. Gráfico da análise de variância "oneway" de log corticóides fecais, durante as três fases do estudo, para fêmeas de gato-maracajá	178



5. Progestágenos, estrógeno e corticóides fecais durante gestação, parto e pós-parto em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e gato-maracajá (*Leopardus wiedii*)

Fig. 1. Perfis da excreção fecal de estrógeno (quadrados vazios), progestágeno (círculos preenchidos) e corticosterona (losangos preenchidos) em fêmea de gato-do-mato-pequeno. A letra P representa o parto 199

Fig. 2. Perfis da excreção fecal de estrógeno (quadrados vazios), progestágeno (círculos preenchidos) e corticosterona (losangos preenchidos) em fêmea de gato-maracajá. A letra P representa o parto e a letra S a separação do filhote..... 200

6. Reprodução em fêmeas de pequenos felídeos neotropicais

Fig. 1. Gato-mourisco ou jaguarundi (*Herpailurus yagouaroundi*) 209

Fig. 2. Perfil durante longo período de estrógeno fecal (quadrados vazios) e de excreção de progestágeno (círculos preenchidos) em uma fêmea de gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) mantida isolada. Esta fêmea apresentou atividade ovariana durante todo o ano e ovulações espontâneas especialmente de setembro a abril..... 211

Fig. 3 Inseminação artificial por laparoscopia em fêmea de felídeo silvestre, realizada no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional..... 217

Fig. 4. Momento da deposição do sêmen durante inseminação artificial por laparoscopia em fêmea de felídeo silvestre, realizada no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional 218



LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

Ac = anticorpo

Acetil-CoA = acetil-coenzima A

Ag = antígeno

AgAc = complexo antígeno-anticorpo

BSA = albumina sérica bovina

C = carbono

CL = corpo lúteo (*corpus luteum*)

CLs = corpos lúteos (*corpora lutea*)

Conc. = concentração

Crtn = corticosterona

DO = densidade óptica

E2 = estrógeno

EIA = enzimoimunoensaio (*enzymeimmunoassay*)

ETOH = etanol

FSH = hormônio folículo-estimulante

GAMG = imunoglobulina caprina anticamundongo (*Goat Anti-Mouse IgG*)

gl = grau de liberdade

h = horas

hCG ou HCG = gonadotropina coriônica humana

HPLC = cromatografia líquida de alta pressão (*high pressure liquid chromatography*)

IBAMA = Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

i.e. = *id est* (isto é)

ISIS = Sistema Internacional de Informação de Espécies (*INTERNATIONAL SPECIES INFORMATION SYSTEM*)

lb = libras

LH = hormônio luteinizante

MEOH = metanol

min = minutos

NaCl = cloreto de sódio

Nei Moreira

CPGZOO / UFPR



ng = nanograma

ng/g = nanograma por grama

NMS = soro de camundongo normal (*Normal Mouse Serum*)

NSB = ligação não específica (*non specific binding*)

P4 = progestágeno

PBS = solução salina tamponada fosfato (*phosphate buffer saline*)

PdG = pregnanediol glicuronido (*pregnanediol glucuronide*), um metabólito (principalmente) urinário da progesterona

PEG = polietilenoglicol

Prob. = probabilidade

QCH = controle de qualidade alto (*quality control high*)

QCL = controle de qualidade baixo (*quality control low*)

RIA = radioimunoensaio (*radioimmunoassay*)

rpm = rotações por minuto

s = segundos

SD = desvio padrão

SEM = erro padrão da média

ug = micrograma

ug/g = micrograma por grama



RESUMO GERAL

O gênero *Leopardus*, estudado neste trabalho, possui três espécies: o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e o gato-maracajá (*Leopardus wiedii*). Essas três espécies estão incluídas na lista oficial de espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção, publicada pelo IBAMA. Para a criação e manutenção de um banco de reserva genético em cativeiro devemos, urgentemente, aumentar a eficiência reprodutiva e diminuir a taxa de mortalidade neonatal. Assim, este trabalho visa especialmente contribuir para esse objetivo, auxiliando na conservação dessas espécies ameaçadas. Uma série de estudos enfocou a (1) comparação entre amostras fecais secas e úmidas para análise por radioimunoensaio de esteróides em felídeos do gênero *Leopardus*; (2) hormônios esteróides reprodutivos e atividade ovariana em felídeos do gênero *Leopardus*; (3) validação de um método de enzimoimunoensaio (EIA) para a determinação de estrógeno em fezes de pequenos felídeos; (4) efeitos das condições de cativeiro nos aspectos reprodutivos e adrenocorticais em fêmeas de gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá; (5) progestágenos, estrógenos e corticóides fecais durante gestação, parto e pós-parto em gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá; (6) reprodução em fêmeas de pequenos felídeos sul-americanos. Houve boa correspondência entre as concentrações de esteróides em amostras fecais secas *versus* úmidas entre as espécies ($P < 0,05$). Com base nos intervalos entre os picos de estrógeno fecal, a duração média (\pm erro padrão) do ciclo estral foi de $18,4 \pm 1,6$ dias para a jaguatirica, $16,7 \pm 1,3$ dias para o gato-do-mato-pequeno e $17,6 \pm 1,5$ dias para o gato-maracajá. Apenas as gatas-maracajá diferiram, exibindo ovulações espontâneas com maior frequência, não induzidas por cópula. O método de EIA foi validado através da demonstração do paralelismo dos resultados com o RIA. As fêmeas de gato-do-mato-pequeno apresentaram um decréscimo na atividade ovariana e um concomitante aumento nas concentrações de cortisol, um indicativo do estresse induzido pela mudança de um recinto grande e ambientado, para um recinto pequeno e vazio. Os perfis hormonais apresentados durante gestação, parto e lactação em gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá assemelham-se muito em linhas gerais aos de outros felídeos, sugerindo que esses mecanismos sejam conservados no táxon, apesar da taxa de excreção de esteróides ser mais espécie-específica. Dessa forma, espera-se que a compreensão da fisiologia reprodutiva e do comportamento dessas espécies, possa conduzir a melhores estratégias de manejo, que resultem em diminuição do estresse e aumento do sucesso reprodutivo.



ABSTRACT

Leopardus genus, here studied, comprises three species: tigrina (*Leopardus tigrinus*), ocelot (*Leopardus pardalis*) and margay (*Leopardus wiedii*). These three species are included in the Brazilian official list of threatened species, published by IBAMA. For the creation and maintenance of a genome resource bank in captivity we have, urgently, to increase the reproductive efficiency and to reduce the neonatal mortality. By this way, this thesis especially seeks to contribute for this aim, aiding in conservation of these threatened species. A series of studies focused on the (1) comparison between dry and wet fecal samples for steroid analysis by radioimmunoassay in felids of the *Leopardus* genus; (2) reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus; (3) validation of an enzymeimmunoassay (EIA) for estrogen determination in feces of small felids; (4) effects of captivity conditions on reproductive and adrenocortical aspects in tigrina and margay females; (5) fecal progestogens, estrogens and corticoids during gestation, parturition and lactation in tigrina and margay; (6) reproduction in South American small felids - females. There was a good correspondence between steroid concentrations in dried versus wet fecal samples across species ($P < 0.05$). Based on intervals between fecal estrogen peaks, mean (\pm SEM) duration of the estrous cycle was 18.4 ± 1.6 days for the ocelots, 16.7 ± 1.3 days for the tigrinas and 17.6 ± 1.5 days for the margays. Only the margays differed by exhibiting more frequently spontaneous, non-mating-induced ovulations. EIA method was validated through parallelism demonstration with RIA. Based on hormonal analyses, tigrina females showed a decrease in ovarian activity and a concurrent increase in corticoid concentrations, which may be an indicator of stress induced by moving cats from a large, enriched enclosure to a small, empty one. Hormonal profiles presented during gestation, parturition and lactation in tigrina and margay resemble a lot, in general lines the other felids, suggesting that these mechanisms are conserved in the taxon, in spite of the steroids excretion rate be more species-specific. By this way, it is hoped that understanding the reproductive physiology and behavior of these species could lead to improved management strategies that may result in decreased stress and increased reproductive success.



I. PREFÁCIO GERAL

A perda contínua e acelerada da biodiversidade global tem desafiado o campo da biologia da conservação, que define os muitos fatores que influenciam ecossistemas e a sobrevivência das espécies. A fragmentação, exploração e poluição dos habitats naturais têm resultado em perdas catastróficas de variabilidade genética causadas pela constrição subsequente de populações [Wildt et al., 1992].

Jardins zoológicos e outras instituições que fazem reprodução *ex situ* compartilham a grande responsabilidade de ajudar a prevenir a rápida extinção de espécies silvestres no Planeta Terra. Ao menos quatorze espécies que haviam sido extintas na natureza, foram salvas através da reprodução em cativeiro. Algumas dessas espécies já têm sido restabelecidas com sucesso em seu ambiente natural, como o bisão europeu, o órix (“*oryx*”) da Arábia, outras estão na fase inicial de restabelecimento, como o furão-de-patas-negras (“*black-footed ferret*”), o condor da Califórnia e o cavalo selvagem da Mongólia. Outras ainda esperam a melhoria das condições do que resta de seu habitat natural (ISIS, 2001).

O papel primário de zoológicos e aquários, como instituições culturais locais, permanece como sendo o de aumentar o interesse público, afeição e conhecimento sobre a vida selvagem. Para manter esse papel, a coleção viva de espécies silvestres, freqüentemente insubstituíveis, deve ser manejada para as gerações futuras. Essas populações *ex situ*, propriamente manejadas, servem tanto como um importante recurso público, como um tipo de “seguro de conservação” contra a extinção dessas espécies na natureza (ISIS, 2001).

A família Felidae é um dos grupos com maior diversidade de carnívoros e inclui espécies que variam em tamanho desde 1 kg até mais de 230 kg (tigre). Esta família compreende um grupo de espécies fenotipicamente díspares que vivem em diversas regiões geográficas. São considerados pequenos felídeos aqueles que na idade adulta pesam menos que 20 kg (Emmons, 1991). A este grupo pertencem 29 espécies, onde na maioria, os machos são maiores que as fêmeas. Este grupo não inclui leão, tigre, leopardo, leopardo-das-neves, onça-pintada (*Panthera* spp.); guepardo (*Acinonyx jubatus*), leopardo nebuloso (*Neofelis nebulosa*) e o puma (*Puma concolor*).



Na natureza, estas espécies são geralmente solitárias e bastante intolerantes com outros adultos do mesmo sexo. Exibem um sistema social espacial e temporalmente disperso (Bekoff, Daniels & Gittleman, 1984).

Todos os felídeos (com exceção do gato doméstico, *Felis catus*) estão no momento, ameaçados em algum grau e várias espécies são vistas como criticamente em perigo (Nowell & Jackson, 1996).

Na América do Sul estão presentes a onça, o puma e oito espécies de pequenos felídeos: gato-do-mato-pequeno, jaguatirica, gato-maracajá, gato-do-mato-grande, "kodkod", gato-palheiro, gato-dos-Andes e gato-mourisco. A linhagem da jaguatirica, definida pelos mais recentes estudos moleculares (Johnson & O'Brien, 1997; Pecon-Slattery & O'Brien, 1998), compreende os pequenos felídeos citados anteriormente, com exceção do gato-mourisco, que pertence à linhagem do puma, junto com o guepardo (Oliveira et al., 2001). Esse grupo da jaguatirica parece ter evoluído e diversificado nos últimos três a seis milhões de anos, durante e após a formação do Canal do Panamá na América Central (Johnson et al., 1998).

O gênero *Leopardus*, estudado neste trabalho, possui três espécies: o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e o gato-maracajá (*Leopardus wiedii*). Essas três espécies estão incluídas na lista oficial de espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção, publicada pelo IBAMA através da Portaria nº 1.522, de 19 de dezembro de 1.989 e da Portaria nº 45-N, de 27 de abril de 1.992.

As áreas de ocorrência, segundo o ISIS (*INTERNATIONAL SPECIES INFORMATION SYSTEM*) e os resultados finais do WORKSHOP FLORESTA ATLÂNTICA E CAMPOS SULINOS (1999), para essas três espécies são as seguintes:

- A. *Leopardus tigrinus*: ocorre da América Central, na Costa Rica, ao Paraguai e norte da Argentina e em quase todo o território do Brasil (na Amazônia, Cerrado, Pantanal, Mata Atlântica e Campos Sulinos). Sua ocorrência ao longo da Mata Atlântica está insuficientemente documentada.
- B. *Leopardus pardalis*: ocorre do sul dos EUA (Arizona) ao sul da América do Sul; no Uruguai, Paraguai, norte da Argentina e por todo o Brasil. Provavelmente já ocorreu por toda a Mata Atlântica mas pode ter sido extinto de amplas extensões por ação antrópica.



- C. *Leopardus wiedii*: ocorre do sul dos Estados Unidos ao Paraguai e norte da Argentina. No Brasil ocorre na Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Campos Sulinos.

Em julho de 2001 existiam, nos 576 zoológicos membros (a grande maioria dos zoológicos brasileiros não está cadastrada) do ISIS, distribuídos em 54 países pelo mundo inteiro, os seguintes números de indivíduos para essas três espécies (ISIS, 2001):

- A. *Leopardus tigrinus*: 17 animais.
 B. *Leopardus pardalis*: 207 animais.
 C. *Leopardus wiedii*: 60 animais.

A Figura 1 mostra a população de felídeos neotropicais em cativeiro no Brasil, segundo o Censo de Animais em Cativeiro de 2000 da Sociedade de Zoológicos do Brasil (SZB).

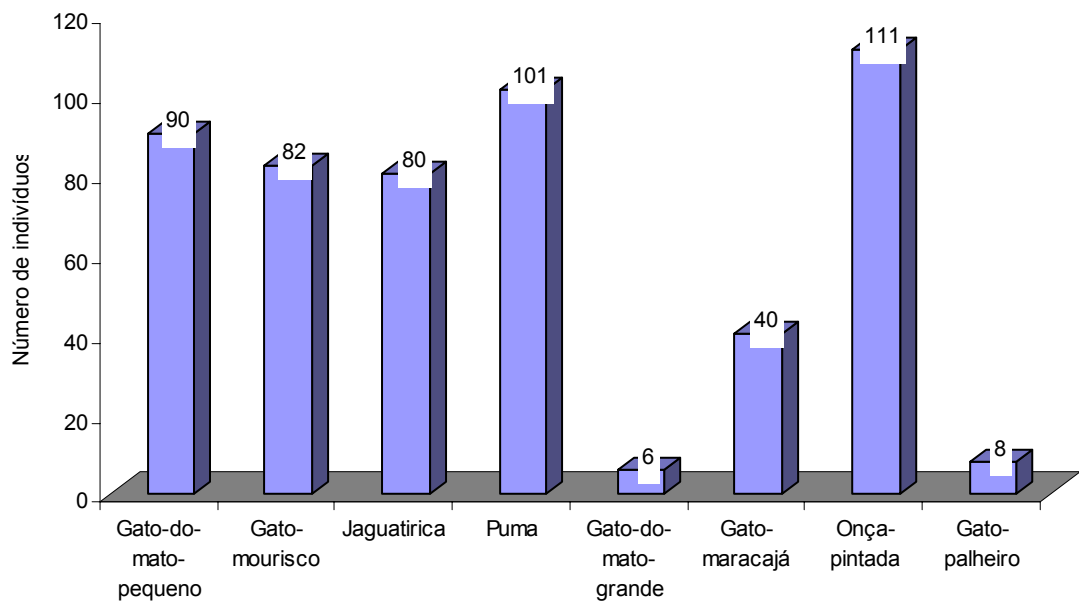


Fig. 1. População de felídeos neotropicais em cativeiro no Brasil em 2000 (Fonte: SZB).



A Figura 2 mostra a evolução da população cativa de felídeos do gênero *Leopardus* no Brasil, para os anos de 1996 a 2000.

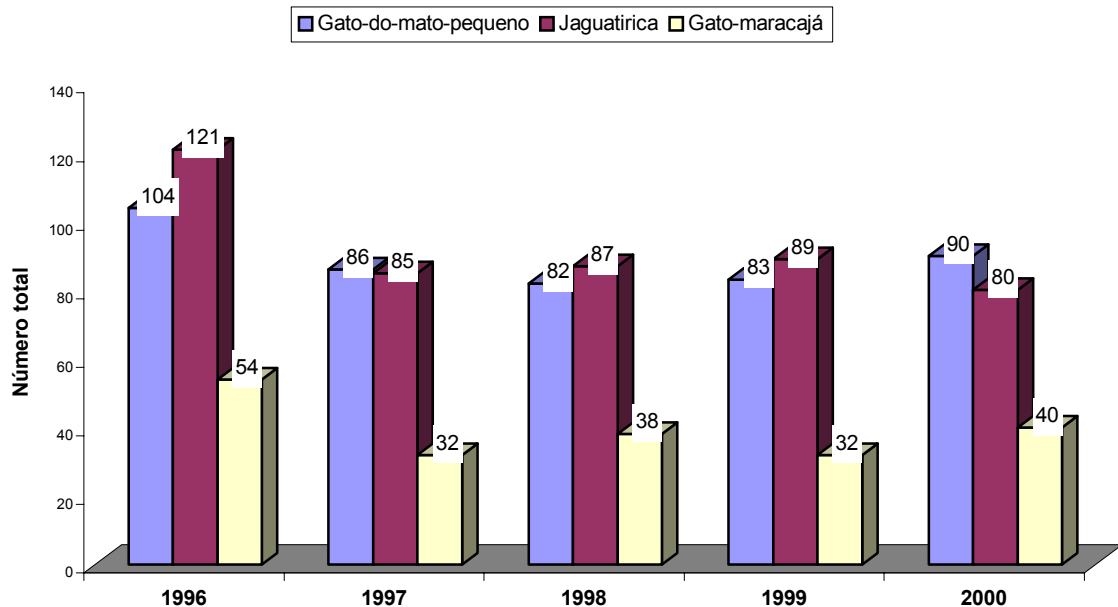


Fig. 2. Número total de animais das três espécies em cativeiro no Brasil, para os anos de 1996 a 2000.

A Tabela 1 mostra as taxas médias de natalidade, mortalidade geral e mortalidade neonatal para as três espécies do gênero *Leopardus*, considerando os anos de 1996 a 2000, segundo dados do Censo de Animais Cativos da Sociedade de Zoológicos do Brasil (SZB), o que nos mostra que a taxa de mortalidade geral é bem superior à taxa de natalidade para gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá; enquanto para a jaguaririca as duas taxas são próximas com ligeiro predomínio da natalidade.



TABELA 1. Médias de natalidade, mortalidade geral e mortalidade neonatal para as três espécies do gênero *Leopardus*, considerando os anos de 1996 a 2000, segundo dados do Censo de Animais Cativos da Sociedade de Zoológicos do Brasil (SZB)

Nome comum	Natalidade N (%)	Mortalidade Geral N (%)	Mortalidade neonatal N (%)*
Gato-do-mato-pequeno	10 (10,9)	16 (17,6)	5 (47,0)
Jaguaririca	11 (11,5)	10 (11,2)	5 (41,0)
Gato-maracajá	1 (3,6)	5 (14,2)	0 (0,0)

*A taxa de mortalidade neonatal refere-se à porcentagem de animais mortos durante os primeiros 30 dias de vida em relação ao número de nascidos.

Com isso podemos concluir que o aumento na população de determinada espécie de pequeno felídeo em cativeiro tem ocorrido, de forma geral, em decorrência do recebimento de animais provenientes da natureza (geralmente através de apreensões feitas pela Polícia Florestal), como ocorreu com o gato-maracajá de 1997 a 1998 e de 1999 a 2000.

No Brasil, segundo o Censo da SZB de 1998, existiam 82 gatos-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), sendo que nesse ano houve uma taxa de mortalidade geral de 15,85%, contra uma taxa de natalidade de apenas 9,76%. Para as 80 jaguariricas (*Leopardus pardalis*) do Censo de 2000, 9 haviam nascido durante o ano, 1 morreu nos primeiros 30 dias e somaram-se 11 mortos no geral. Ou seja, a porcentagem de mortos (13,75%) foi superior à porcentagem de nascidos (11,25%). Para o gato-maracajá, de 40 indivíduos houve apenas 1 nascimento e 4 mortos no geral, perfazendo 10% de mortalidade contra 2,5% de natalidade.

Analisando-se as Figuras 3 e 4, percebe-se facilmente o terrível quadro da situação dessas espécies em cativeiro no Brasil, que reflete o que acontece em toda a América Latina.

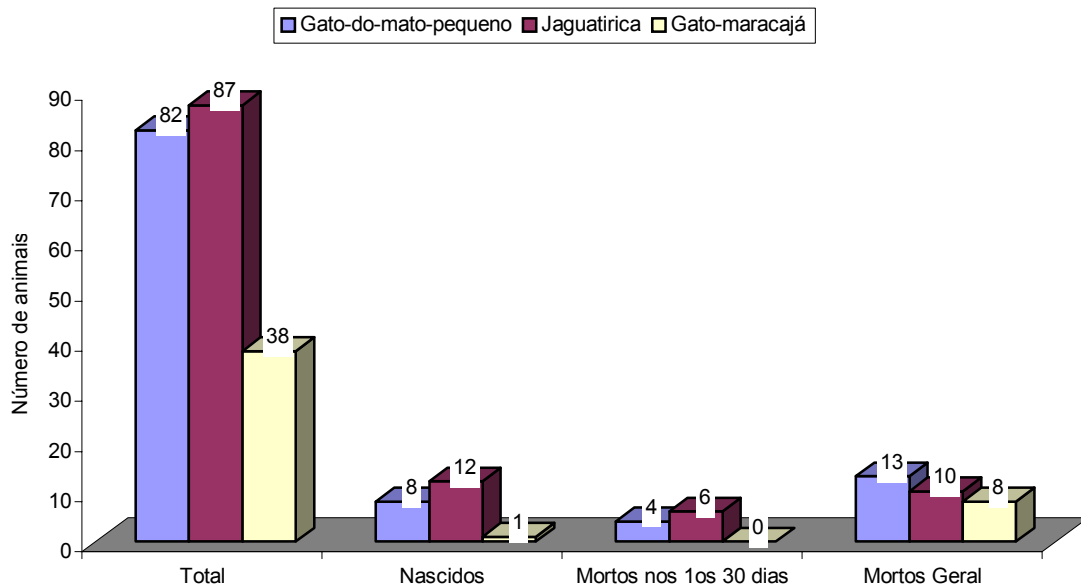


Fig. 3. Censo de felídeos do gênero *Leopardus* em cativeiro no Brasil em 1998.

A taxa de mortalidade neonatal para jaguaririca e gato-do-mato-pequeno foi de 50%, ou seja, a metade dos filhotes nascida em 1998 morreu nos primeiros 30 dias. Considerando os anos de 1996, 1997 e 1998; a taxa média de mortalidade neonatal (mortos nos primeiros 30 dias/nascidos) foi de 47% para gato-do-mato-pequeno e 57% para jaguaririca. Acompanhando a evolução anual, podemos verificar através do Censo 2000 da SZB, que a situação não modificou seu quadro geral, com mortalidade superior à natalidade para gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá; e valores semelhantes para jaguaririca (Fig. 4).

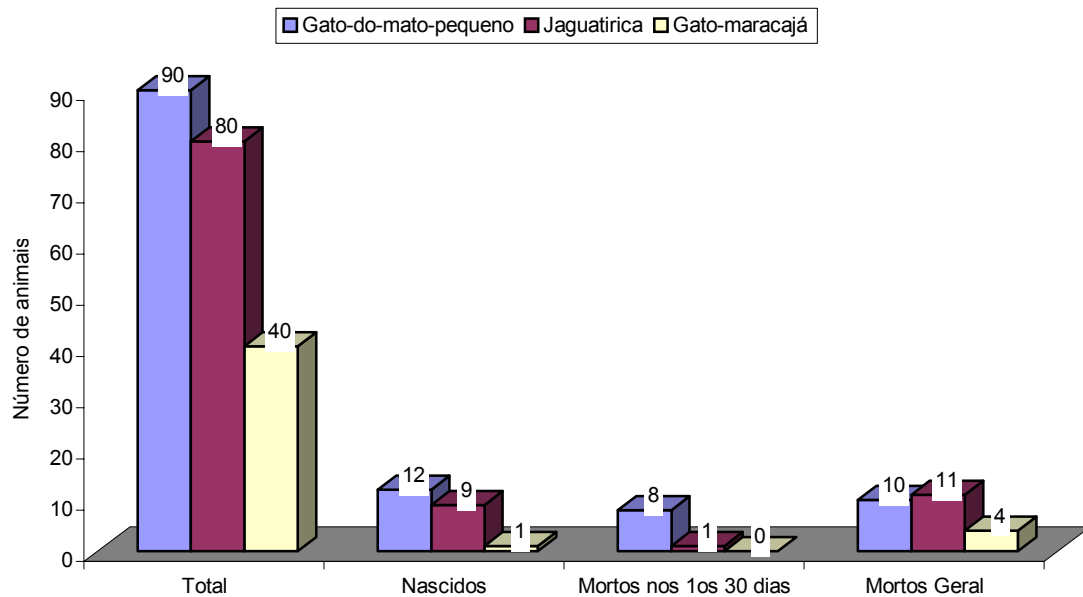


Fig. 4. Censo de felídeos do gênero *Leopardus* em cativeiro no Brasil em 2000 (Fonte: Censo 2000 SZB).

Para a criação e manutenção de um banco de reserva genético em cativeiro devemos, urgentemente, aumentar a eficiência reprodutiva e diminuir a taxa de mortalidade neonatal. Assim, este trabalho visa especialmente contribuir para esse objetivo, auxiliando na conservação dessas espécies ameaçadas de extinção.

O salvamento de espécies ameaçadas nunca será alcançado apenas com a utilização da biotecnologia. Decisões políticas, economias globais e locais e a utilização dos recursos naturais impactam de uma forma muito intensa para permitir soluções tão simplistas. A biotecnologia, entretanto, tem um potencial tremendo como uma ferramenta para auxiliar a conservação de espécies ameaçadas (Wildt, 1997; Bainbridge & Jabbour, 1998; Howard, 1999), particularmente com relação ao manejo de pequenas populações em cativeiro.

Dentro da ordem Carnivora, as famílias Felidae e Canidae possuem vários representantes que estão ameaçados e que poderiam beneficiar-se da biotecnologia. Pouco a pouco, os cientistas estão começando a desvendar os mistérios e montar o quebra-cabeça da reprodução desses predadores severamente perseguidos (Goodrowe et al., 2000).

A fisiologia reprodutiva de pequenos felídeos neotropicais não tem sido estudada extensivamente. Mais propriamente, a maioria dos estudos biológicos de felídeos



tem focalizado o gato doméstico, que se tornou um modelo intensivamente utilizado para a investigação de mecanismos ovulatórios reflexos. Estudos iniciais determinaram que estimulação coital não fértil da gata doméstica em estro resultou na formação de corpos lúteos (CLs) e uma fase luteal prolongada freqüentemente denominada pseudogestação (Greulich, 1934; Foster & Hisaw, 1935; Dawson & Friedgood, 1940). Estudos que examinaram a liberação reflexa de LH em gatas no estro, após uma ou múltiplas cópulas em um único dia de estro indicaram que, devido à deficiência na liberação de LH, a gata nem sempre ovula após um único estímulo copulatório (Concannon et al., 1980; Wildt et al., 1980). Adicionalmente, a freqüência da estimulação coital desempenhou um papel principal, influenciando a proporção de fêmeas que ovularam, com a copulação múltipla aumentando a magnitude e a duração da liberação de LH.

Em gatos domésticos, estradiol, progesterona (Shille et al. 1990, Brown et al. 1994) e testosterona (Brown et al. 1996) são excretados quase que exclusivamente nas fezes. Em felídeos, pouca ou nenhuma imunoatividade com relação à progesterona está associada à forma nativa do esteróide (Möstl et al. 1993; Brown et al. 1994, 1996), ao passo que a imunoatividade com relação ao estrógeno corresponde primariamente ao estradiol não conjugado (Brown et al. 1994). Dessa forma, para quantificar-se a atividade esteroidogênica gonadal em felídeos domésticos e silvestres, sugere-se que um imunoenensaio padrão para estradiol seja efetivo para a descrição da dinâmica folicular, ao passo que as funções luteal e testicular são mais bem caracterizadas utilizando-se sistemas de ensaio que empreguem anticorpos que reajam de forma cruzada com um amplo espectro de metabólitos relacionados (Brown et al. 1994, 1996).



REFERÊNCIAS

1. Bainbridge, D.R.J. & Jabbour, H.N. (1998) Potential of assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity: a review. *Vet. Rec.* 143:159-168.
2. Bekoff, M., Daniels, T. & Gittleman, J. (1984) Life history patterns and comparative social ecology of carnivores. *Annual Review of Ecological Systems* 15:191-232.
3. Brown, J. L., Wasser, S. K., Wildt, D. E. & Graham, L. H. (1994) Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured non-invasively in feces. *Biol. Reprod.* 51:776-786.
4. Brown, J. L., Terio, K. A. & Graham, L. H. (1996) Fecal androgen metabolite analysis for non-invasive monitoring of testicular steroidogenic activity in felids. *Zoo Biol.* 15:425-434.
5. Concannon, P., Hodgson, B. & Lein, D. (1980). Reflex LH release in estrous cats following single and multiple copulations. *Biol. Reprod.* 23:111-117.
6. Dawson, A. B. & Friedgood, H. G. (1940). The time and sequence of preovulatory changes in the cat ovary after mating or mechanical stimulation of the cervix uteri. *Anat. Rec.* 76:411-429.
7. Emmons, L. (1991). Body size and feeding tactics. In: Seidensticker & Lumpkin (eds.), *The Great Cats*. Rodale Press, Emmaus, PA, p. 62.
8. Foster, M. A. & Hisaw, F. L. (1935). Experimental ovulation and resulting pseudopregnancy in anestrus cats. *Anat. Rec.* 62:75-93.
9. Goodrowe, K.L., Walker, S.L., Ryckman, D.P., Mastromonaco, G.F., Hay, M.A., Bateman, H.L. & Waddell, W.T. (2000) Piecing together the puzzle of carnivore reproduction. *Animal Reproduction Science* 60-61:389-403.
10. Greulich, W. W. (1934). Artificially produced ovulation in the cat (*Felis domestica*). *Anat. Rec.* 58:217-224.
11. Howard, J.G. (1999) Assisted reproductive techniques in nondomestic carnivores. In: Fowler, M.E. & Miller, R.E. (Eds.), *Zoo and Wild Animal Medicine*. Saunders, Toronto, pp. 449-457.



12. ISIS, 2001. *INTERNATIONAL SPECIES INFORMATION SYSTEM*. [Online] 17/7/2001. URLs:
 <<http://156.99.114.200/joinisis/fundamentals.asp>>
 <<http://156.99.114.200/abstracts/Mammalia.asp>>.
13. Johnson, W.E., Culver, M., Iriarte, J.A., Eizirik, E., Seymour, K.; & O'Brien, S.J. (1998) Tracking the elusive Andean Mountain Cat (*Oreailurus jacobita*) from mitochondrial DNA. *Journal of Heredity* 89:227-232.
14. Johnson, W.E.; & O'Brien, S.J. (1997) Phylogenetic reconstruction of the Felidae using 16S rRNA and NADH-5 mitochondrial genes. *Journal of Molecular Evolution* 44:S98:S116.
15. May, R. M., & Lyles, A. M. (1987) Living Latin binomials. *Nature (London)* 326:643-643.
16. Möstl E., Lehmann H., & Wenzel, U. (1993) Gestagens in the faeces of mink and cats for monitoring corpus luteum activity. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)* 47:540-541.
17. Nowell, K. & Jackson, P. (1996) *Wild cats: Status Survey and Conservation Action Plan*. Gland, Switzerland, IUCN / SSC Cat Specialist Group, p. 382.
18. Oliveira, T.G., Eizirik, E., Crawshaw-Jr., P.G., Adania, C.H., Gomes, M.S., Moraes, W., Silva, J.C.R., Moreira, N., Morato, R.G., Paz, R.C.R. & Morais, R.N. (2001) Order Carnivora, Family Felidae (Cat). In: Fowler, M.E. & Cubas, Z.S. (Eds.), *Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals*. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 291-316.
19. Pecon-Slaterry, J. & O'Brien, S.J. (1998) Patterns of X and Y chromosome DNA sequence divergence during the Felidae radiation. *Genetics* 148:1245-1255.
20. Shille, V. M., Haggerty, M. A., Shackleton, C. & Lasley, B. L. (1990) Metabolites of estradiol in serum, bile, intestine and feces of the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology* 3:779-794.
21. Wildt, D. E., Seager, S. W. J. & Chakraborty, P. K. (1980) Effect of copulatory stimuli on incidence of ovulation and on serum luteinizing hormone in the cat. *Endocrinology* 107, 1212-1217.
22. Wildt DE, Monfort SL, Donoghue AM, Johnston LA, Howard J. (1992) Embryogenesis in conservation biology - or, how to make an endangered species embryo. *Theriogenology* 37:161-184.



23. Wildt, D.E. (1997) Genome resource banking: impact on biotic conservation and society. In: Karrow, A.M. & Critster, J. (Eds.), Reproductive Tissue Banking. Academic Press, New York, pp. 399-439.
24. Workshop “Floresta Atlântica e Campos Sulinos”. [Online] 3/9/2001. URL <http://www.bdt.org.br/workshop/mata.atlantica/BR/rfinais/rt_mamiferos>.



II. CAPÍTULOS



1. Comparação entre amostras fecais secas e úmidas para análise por radioimunoensaio de esteróides em felídeos do gênero *Leopardus*

RESUMO

Uma comparação entre as análises de esteróides (estrógenos e progestágenos) em amostras fecais secas *versus* úmidas foi conduzida em fezes de fêmeas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*; n = 3), jaguatirica (*Leopardus pardalis*; n = 4) e gato-maracajá (*Leopardus wiedii*; n = 2), alojadas individualmente em cativeiro na Região Sul do Brasil. Para análise em peso úmido, as amostras foram descongeladas e bem misturadas antes da extração de esteróide. Após a remoção das alíquotas para análise em peso úmido, as amostras fecais remanescentes foram liofilizadas e pulverizadas por esmagamento para análise em peso seco. Os esteróides foram extraídos através da fervura de aproximadamente 0,5 g de fezes úmidas ou aproximadamente 0,2 g de pó fecal seco em 5 ml de etanol aquoso (90%) durante 20 min. Houve boa correspondência entre as concentrações de esteróides em amostras fecais secas *versus* úmidas entre as espécies ($P < 0,05$). As médias globais das correlações foram $r = 0,82$ (variação, $r = 0,73-0,96$) e $r = 0,49$ (variação, $r = 0,30-0,72$) para estrógenos e progestágenos, respectivamente. Através da análise dos gráficos, foram freqüentemente observados valores mais altos para as concentrações hormonais obtidas de fezes secas, o que já era esperado, pois durante seu processamento a água é eliminada. De qualquer forma, os picos de concentrações hormonais foram coincidentes, o que é mais importante na análise visual e qualitativa dos gráficos, do que propriamente os valores absolutos das concentrações hormonais. As correlações foram maiores para as concentrações de progestágenos durante as fases luteais. A eliminação de uma etapa trabalhosa (secagem) e que consome muito tempo, permite o processamento das amostras de uma forma mais fácil, rápida e barata, sem perda da qualidade dos resultados finais. Como os perfis de esteróides foram qualitativamente similares, a análise de amostras úmidas apresenta vantagens, principalmente quando se trabalha com um grande número de amostras do mesmo indivíduo, coletadas durante longo período.



Palavras-chave: esteróides fecais; estrógenos; progestágenos; monitorização não invasiva



ABSTRACT

Fecal samples were collected from female tigrinas (*Leopardus tigrinus*; n = 3), ocelots (*Leopardus pardalis*; n = 4), and margays (*Leopardus wiedii*; n = 2), housed as singletons in captivity in southern Brazil. A comparison was made between steroid (estrogens and progestogens) concentrations in dried versus wet fecal samples in the three studied species. For wet weight analysis, samples were thawed and well mixed before steroid extraction. After aliquots for wet weight analyses were removed, the remaining fecal samples were lyophilized and powdered by crushing for dry weight analysis. Steroids were extracted by boiling approximately 0.5 g of wet feces or approximately 0.2 g of dried fecal powder in 5 mL aqueous ethanol (90%) for 20 minutes. There was a good correspondence between steroid concentrations in dried versus wet fecal samples across species ($P < 0.05$). Overall correlations were $r = 0.82$ (range, $r = 0.73-0.96$) and $r = 0.49$ (range, $r = 0.30-0.72$) for estrogens and progestogens, respectively. Higher concentrations obtained from dry feces were frequently observed, what was already anticipated, since water was eliminated during lyophilization. Hormonal concentration peaks were coincident, which is more important in visual and qualitative graph analysis, than properly absolute values of hormonal concentrations. Correlations were higher for progestogen concentrations during non-pregnant luteal phases. Elimination of a difficult and time consuming step allows the processing of samples in an easy, fast and cheap way, without losing final results quality. As the steroid profiles were qualitatively similar, wet samples analysis presents advantages, mainly when we consider processing a great number of samples from the same individual, collected during a long period.

Key words: fecal steroids; estrogens; progestogens; non-invasive monitoring



INTRODUÇÃO

O estradiol, a progesterona e a testosterona são todos hormônios esteróides. Os hormônios esteróides possuem uma estrutura comum derivada do colesterol. Esses esteróides são produzidos principalmente pelos testículos e ovários e após sua circulação no sangue, são removidos do organismo por sulfatação ou glicuronidação (predominantemente) no fígado. Um grupo sulfato ou glicuronato é ligado ao hormônio para torná-lo hidrossolúvel, de tal forma que este seja livremente filtrado na urina pelo rim. Normalmente, hormônios esteróides na circulação são ligados a proteínas plasmáticas, tais como globulina ligante de esteróide sexual ou albumina. Os esteróides são metabolizados a outras formas antes da excreção; geralmente são excretados como conjugados na urina e podem (ex.: gato, ave) ou não (ex.: babuíno) ser, ao menos parcialmente, conjugados nas fezes (Anneke Moresco-Pimentel, apostila do Laboratório de Endocrinologia, *Conservation and Research Center - Smithsonian Institution*; Chard, 1989).

O radioimunoensaio (RIA) é um método desenvolvido para medir a concentração de um metabólito particular ou proteína (ex.: esteróides, receptores, etc.) em uma determinada amostra (urina, extrato fecal, soro, etc.). O método utiliza a especificidade dos anticorpos para ligarem-se a certas estruturas denominadas antígenos (Chard, 1989). Nesse caso os antígenos de interesse são hormônios esteróides.

O RIA tem quatro elementos:

- a) o esteróide na amostra (“hormônio frio” em quantidade desconhecida);
- b) esteróide radioativo (“hormônio quente”, idêntico em função ao esteróide não radioativo e adicionado em uma quantidade conhecida);
- c) anticorpo;
- d) uma maneira de separar a fração do esteróide ligada da não ligada.

Adicionando-se quantidades conhecidas de hormônio esteróide “quente” e anticorpo, a uma quantidade desconhecida de hormônio “frio” na amostra, cria-se competição entre hormônio quente e frio para ligar ao anticorpo. Dessa forma, a medida da quantidade de hormônio quente ligado ao anticorpo (ou não ligado, dependendo do método de separação) possibilita o cálculo da concentração do hormônio “frio”.



A única diferença entre hormônio “frio” e “quente” é que o hormônio “quente” está rotulado com um marcador, freqüentemente radioativo. ^3H (*tritium*), ^{14}C e ^{125}I são marcadores comuns.

O mecanismo do RIA consiste em adicionar, a uma quantidade desconhecida de hormônio “frio”, uma quantidade conhecida de hormônio “quente” e de anticorpo. Dessa forma, ocorre competição entre os hormônios pela quantidade limitada de sítios de ligação no anticorpo. Após um período de incubação longo o suficiente para a reação (hormônio + anticorpo = complexo hormônio/anticorpo) ter alcançado o equilíbrio, a fração ligada é separada da não-ligada.

Visto que a quantidade de hormônio “quente” é constante, quanto mais hormônio “frio” houver na amostra, menor a quantidade de hormônio “quente” ligado ao anticorpo. Isso significa que, quando a fração ligada for contada, menor radioatividade estará presente.

Compreender os padrões endócrinos e suas inter-relações e como a função reprodutiva é influenciada por um conjunto hormonal individual, são aspectos que freqüentemente não recebem ênfase nos estudos científicos e no desenvolvimento de biotecnologias. Entretanto, as informações básicas obtidas através de estudos endócrinos podem ser essenciais no sucesso ou fracasso da reprodução de espécies (Goodrowe et al., 2000).

Embora a resolução em uma escala por minuto/hora seja perdida, a análise não invasiva de hormônios fecais ou presentes na urina é efetiva na definição e na monitorização durante longo período de eventos reprodutivos em espécies silvestres (Bamberg et al., 1991; Lasley & Kirkpatrick, 1991), além de eliminar o potencial estresse associado com a colheita de sangue.

A proposta desse estudo foi comparar a utilização de amostras fecais secas e úmidas para a dosagem de hormônios esteróides reprodutivos (estrógenos e progestágenos) em felídeos, na tentativa de encontrar-se um método mais fácil, rápido e barato, sem perda da qualidade dos resultados finais.



MATERIAL E MÉTODOS

Animais e Colheita de Amostras Fecais

Foram utilizadas fêmeas adultas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, n = 3), jaguatirica (*L. pardalis*, n = 4) e gato-maracajá (*L. wiedii*, n = 2), procedentes do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional e do Zoológico de Curitiba. Dessas fêmeas foram colhidas amostras fecais, cinco dias por semana, as quais foram colocadas em sacos plásticos⁶, identificadas¹⁹ e, imediatamente, congeladas e armazenadas (-20 °C) até o momento do transporte em gelo seco para o Centro de Conservação e Pesquisa (*Conservation and Research Center – Smithsonian Institution*) para análise. As amostras foram processadas segundo os métodos descritos neste trabalho.

Produção do anticorpo

As moléculas de esteróide pesam entre 200 a 300 g/mol e são portanto haptenos, isto é, uma molécula muito pequena para desencadear uma resposta imune por si própria. Isso significa que um esteróide não pode ser um imunógeno, mas pode ser um antígeno. Para produzir um anticorpo para um hormônio esteróide específico, o esteróide necessita ser ligado a um "carreador" maior (ex.: BSA, albumina sérica bovina). Essa solução complexa é então injetada via subcutânea em um coelho ou outro animal. O animal irá então desenvolver anticorpos para esse complexo particular. Um adjuvante é geralmente adicionado à solução hormonal para estimular ainda mais a resposta imune. Um adjuvante é uma mistura de óleo mineral, detergente e micobactérias mortas. O óleo e o detergente criarão uma solução aquosa na qual pequenas gotas de óleo estão contidas. Isto é para retardar a absorção e para maximizar a exposição ao sistema imune. As micobactérias fornecem um estímulo não-específico ao sistema imune resultando na proliferação de macrófagos e linfócitos. Após várias semanas, uma segunda injeção de imunógeno é dada ao animal para induzir a fase secundária da resposta imune. Grandes quantidades de anticorpo são produzidas durante essa segunda fase. Subseqüentemente, colhe-se o soro do animal, contendo os anticorpos anti-hormônio produzidos pelos linfócitos B.



Proporção dos elementos em um ensaio

A relação ideal da mistura anticorpo/antígeno "quente" é aquela em que 20-50% de todos os sítios de anticorpo são ocupados por antígeno "quente" na ausência de antígeno "frio". Esses valores permitem competição máxima pelos sítios de ligação do anticorpo. O anticorpo deve sempre ser o fator limitante.

Para determinar a concentração de anticorpo necessária, uma concentração constante de antígeno "quente" foi incubada com várias concentrações de anticorpo e as porcentagens de ligação foram confrontadas com as diluições de anticorpo (em escala logarítmica). Da curva resultante, as diluições corretas de anticorpo que foram utilizadas corresponderam à variação entre 20 a 50% de ligação.

Extração de hormônios das amostras fecais

Uma comparação foi feita entre as análises de esteróides conduzidas nas mesmas amostras fecais, comparando-se secas *versus* úmidas. Para análise em peso úmido, as amostras foram descongeladas e bem misturadas antes da extração de esteróide. Após a remoção das alíquotas para análise em peso úmido, as amostras fecais remanescentes foram liofilizadas e pulverizadas por esmagamento para análise em peso seco. Os esteróides foram extraídos através da fervura de, aproximadamente²¹, 0,5 g de fezes úmidas e, aproximadamente, 0,2 g de pó fecal seco em 5 ml de etanol aquoso (90%) durante 20 min.

1. Para a secagem das amostras, estas foram centrifugadas em frascos especiais, para posterior homogeneização e pesagem (processo trabalhoso e que consome muito tempo). Para o processamento das amostras úmidas, foram apenas retirados aproximadamente 0,5 g (0,45-0,55 g) de cada amostra previamente descongelada e homogeneizada em tubos de ensaio numerados de vidro 16 X 125 mm. Foi anotado o peso exato de cada amostra, bem como as amostras que continham grande quantidade de pelos.
2. Foram adicionados 0,5 ml de água destilada e 0,5 ml de ETOH⁸ (etanol) a cada tubo e homogeneizados (em um agitador "vortex") muito brevemente.
3. Foram adicionados 4,0 ml de ETOH a cada tubo e homogeneizados brevemente (em um agitador "vortex").



4. Os tubos foram aquecidos (em séries de 108 tubos) em banho-maria (90°C) durante 20 min. Foi adicionado ETOH às amostras quando estas pareciam estar secas.
5. O volume de cada extrato foi aproximadamente reconstituído com ETOH ao nível pré-aquecimento.
6. As amostras foram centrifugadas¹² a 1500 rpm durante 20 min, sempre certificando-se de que a centrífuga estava equilibrada.
7. Os extratos (constituídos pelo sobrenadante) foram entornados em uma segunda série de tubos⁵ 16 X 125 mm identificados da mesma forma.
8. Foram adicionados 4,5 ml de ETOH e 0,5 ml de água destilada aos tubos originais contendo os péletes fecais, em seguida cada tubo foi homogeneizado (agitador "vortex") durante 30 s.
9. Esses tubos foram centrifugados a 1500 rpm durante 15 min.
10. O extrato foi entornado dentro da segunda série de tubos contendo o primeiro extrato.
11. A segunda série de tubos foi evaporada sob ar pressurizado em um banho-maria¹⁰ morno (aproximadamente 50 °C) no interior de um exaustor¹¹. Tomou-se o cuidado de não deixar as pontas do aparato de secagem tocarem as amostras, ou elas teriam sido contaminadas. Enquanto isso se enxaguava a primeira série de tubos, os quais eram deixados de molho em uma bacia de água com sabão.
12. Foram numerados tubos plásticos 12 X 75 mm.
13. Foi adicionado 1 ml de MEOH⁹ (metanol) à segunda série de tubos (já evaporada), que em seguida foram agitados (*vortex*¹⁵) brevemente, colocados no "limpador ultrassônico" ("*ultrasonic cleaner*")¹ durante 15 min e preparadas as diluições. Ex.: 200 µl do extrato + 1800 µl de tampão PBS = diluição 1:10 para armazenamento a - 20°C. A diluição varia com a espécie e com o anticorpo utilizado.

Radioimunoensaio - Métodos de separação das frações ligada e não-ligada

As frações ligada e não-ligada são segregadas por uma técnica de separação e então centrifugadas. O complexo hormônio-anticorpo é muito pequeno para ser "empurrado para baixo" em um pélete; portanto um segundo reagente necessita ser adicionado à solução. Há dois métodos importantes para anexar uma molécula suficientemente grande a uma das frações para permitir que ela seja "empurrada para baixo". O primeiro é através da adição de



carvão (utilizado para estradiol). As moléculas de carvão absorvem apenas as moléculas do marcador não ligado, porque essas são pequenas o suficiente para encaixarem-se através da superfície porosa da molécula de carvão e ficarem presas lá. O carvão utilizado na separação das frações ligada e não-ligada é normalmente coberto com dextran. O dextran é um açúcar que faz com que os poros do carvão fiquem menores e com maior adsorção; ele auxilia na adsorção do marcador não-ligado ao carvão, de forma que ele não volte à solução. Dessa forma quando a solução é centrifugada, o marcador livre é empurrado para dentro do pélete e o hormônio ligado permanece no sobrenadante. É esse sobrenadante que é contado.

O segundo método utiliza um **segundo anticorpo** (utilizado para progéstágeno). Este segundo anticorpo é um anticorpo que ligar-se-á ao primeiro anticorpo. Nesse caso o hormônio ligado será o complexo mais pesado. Após a centrifugação o pélete irá conter a fração ligada, esse componente que é contado. O soro de camundongo normal (NMS, *normal mouse serum*) contém os anticorpos normalmente presentes no soro de camundongo e nenhuma inoculação é necessária. O soro de camundongo normal auxilia na precipitação do hormônio ligado por desempenhar um papel de ligação cruzada. Apenas após a ligação cruzada é que o complexo torna-se pesado o suficiente para ser separado por centrifugação.

Ensaio para progesterona (P4) I¹²⁵

Realizado conforme o seguinte protocolo:

1. Foram identificados tubos de vidro⁷ 12 X 75 mm com a seguinte ordem:
 - 2 Totais
 - 2 NSB ("*non specific binding*")
 - 4 Zeros (2 aqui e 2 no final, após as amostras)
 - 3 de cada um dos padrões de 3,75; 7,5; 15; 30; 60; 120 e 240
 - 2 de cada controle de qualidade alto (QCH - *quality control high*) e controle de qualidade baixo (QCL, *quality control low*) para monitorar a variação interensaio (*i.e.* esses resultados devem ser os mesmos em cada ensaio de P4)
 - 2 para cada amostra (consecutivamente de 1 a 50 ou o número de amostras processadas, até 100 amostras por curva padrão)



2. Foram adicionados¹⁷ 300 µl de tampão RIA aos NSB's e Zeros, 200 µl a cada padrão, QCH, QCL e tubo com amostra.
3. Foram adicionados 100 µl de cada padrão aos tubos apropriadamente identificados.
4. Foram adicionados 300 µl do controle de qualidade para P4 aos tubos QCH e 100 µl aos tubos QCL em duplicata.
5. Foram adicionados²⁰ 100 µl das amostras diluídas aos tubos apropriados.
6. Para fazer a mistura Soro de Camundongo Normal (NMS - *Normal Mouse Serum*) + 1º Anticorpo, foi utilizado o seguinte protocolo:

Exemplo: para um ensaio de 200 tubos → $200 + 10\% = 220$ tubos

NMS (Soro de Camundongo Normal a 1:400)

O número de tubos no ensaio multiplicado por 100 fornece o número de µl da mistura do 1º anticorpo em tampão RIA necessário. Primeiro prepara-se a mistura NMS 1:400 (2,5 µl/ml), isto é, 55 µl de NMS são adicionados a 22000 µl de tampão RIA para um ensaio de 220 tubos. Adiciona-se 100 µl dessa mistura NMS 1:400 a cada NSB.

P4 Ac1 (1:150.000)

O número de µl da mistura do primeiro anticorpo necessários para o ensaio dividido por 150 fornece o número de µl do P4 Ac (já a 1:1000) para adicionar à mistura NMS preparada na etapa anterior. Isto é, 146,7 µl de anticorpo P4 aos 22 ml (22000 µl) da mistura de NMS para um ensaio de 220 tubos.

7. Foram adicionados 100 µl de marcador P4 I¹²⁵ a cada tubo.
8. Foram adicionados 100 µl da primeira mistura de anticorpo a todos os tubos, com exceção dos Totais e dos NSBs.
9. Incubação no refrigerador por 3 h.
10. Para preparar a mistura do 2º anticorpo

PEG (5%)

Número de tubos na análise = nº de ml de PBS rosa (*pink*) necessário (mantido no refrigerador). Dividia-se o nº de ml de PBS rosa necessário por 20 para ter o nº de gramas de PEG para adicionar ao PBS rosa. Por exemplo, necessitava-se 11 g em 220 ml de PBS rosa para um ensaio de 220 tubos. Agitar, com o auxílio de um agitador magnético, até que o PEG esteja dissolvido.



GAMG Ac2 (1:1000)

O nº de ml da mistura de PEG feita na etapa anterior dividido por 1000 fornece o nº de ml de GAMG a ser adicionado à mistura de PEG. Por exemplo, são necessários 0,22 ml de GAMG em 220 ml de mistura PEG para um ensaio de 220 tubos. Armazenar essa mistura de segundo anticorpo no refrigerador até o momento do uso.

11. Após 3 h de incubação, adicionava-se 1 ml da mistura do segundo anticorpo a todos os tubos, com exceção dos totais.
12. Nova incubação no refrigerador por 1 h.
13. Centrifugava-se a 3000 rpm durante 25 min e decantava-se imediatamente após. Os totais não eram decantados.
14. Os tubos foram contados no contador gama ("gamma counter")³.

Ensaio para estradiol (E2) ³H

1. Foram identificados tubos de vidro 12 X 75 mm com a seguinte ordem:
 - 2 Totais
 - 2 NSB ("non specific binding")
 - 6 zeros
 - 3 de cada um dos padrões de 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320
 - 2 de cada controle de qualidade alto (QCH - *quality control high*) e controle de qualidade (QCL, *quality control low*) para monitorar a variação interensaio (*i.e.* esses resultados devem ser os mesmos em cada ensaio de E2)
 - 2 para cada amostra (consecutivamente de 1 a 50 ou o número de amostras processadas, até 80 amostras por curva padrão).
2. Foram adicionados 1300 µl de PBS a cada Total, 800 µl aos NSB's, 500 µl aos Zeros, 400 µl a cada padrão, QCH, QCL e tubo com amostra. Dois dos Zeros foram colocados após os NSBs, dois após os QCs e dois no final do ensaio.
3. Foram adicionados 100 µl de cada padrão aos tubos apropriadamente identificados.
4. Foram adicionados 25 µl e 100 µl do controle de qualidade em duplicata para o QCL e QCH, respectivamente, nos tubos apropriados.
5. Foram adicionados 100 µl de amostra diluída aos tubos apropriados.
6. Foram adicionados 100 µl de marcador estradiol ³H a todos os tubos.



7. Foram adicionados 200 µl de anticorpo a cada tubo, exceto Totais e NSB's.
8. Incubou-se no refrigerador por 3 h.
9. O ensaio foi colocado em um banho gelado e foram adicionados 500 µl de carvão (que já estava sendo agitado por 10 min em água gelada) a todos os tubos, exceto os Totais. O carvão foi adicionado rapidamente.
10. Incubou-se no banho gelado por 15 min e então se centrifugou por 12,5 min a 2500 rpm.
11. Cada tubo foi despejado em um frasco de cintilação. Foram adicionados 3 ml de coquetel de cintilação, em seguida os frascos foram tampados, agitados e identificados. Os frascos ficaram descansando durante no mínimo uma hora.
12. O contador beta¹⁴ foi carregado com os frascos, de tal forma que todos os 6 tubos zeros ficassem após os NSB's e contados no usuário nº 7 (anteriormente programado no computador para dosagem de estradiol). Colocou-se o suporte vermelho de parada no final do ensaio e checkou-se a impressora.

Contando a fração ligada

Dependendo do tipo de marcador usado no ensaio, a fração ligada foi contada em um contador gama (γ -counter, ¹²⁵I para progestágeno) ou beta¹³ (β -counter, ³H para estradiol).

Quando a radioatividade foi contada no contador- β , foi utilizado coquetel de cintilação (*scintillation cocktail*). Essa é uma mistura contendo substâncias fluorescentes que amplificam o efeito da radioatividade por ³H, através da emissão de fótons quando atingidas pelas partículas β . Essas são passadas através de um tubo fotomultiplicador que transforma essa energia em pulsos elétricos que podem então ser contados por circuitos eletrônicos.

Os raios γ (gama) têm um alto poder de penetração, assim não é necessária amplificação do sinal e não se utiliza coquetel de cintilação.

Tubos de contagem total, ligação não específica e zero

Cada ensaio incluiu tubos de contagem total, tubos de ligação não específica (NSB, *non-specific binding*) e tubos zero. Os tubos de contagem total (TC, *total count*) representam a quantidade total de radioatividade adicionada por tubo. O NSB dividido pelo



TC fornece a porcentagem de **ligação não específica**, que representa a porcentagem de radioatividade ligada a alguma outra coisa, que não o anticorpo. Essa deve ser inferior a 5%.

As contagens das amostras foram divididas pelas contagens do tubo zero para calcular a porcentagem de ligação, que foi utilizada para ler a massa correspondente a partir da curva padrão.

Avaliação dos Dados

Os resultados das concentrações de estrógenos fecais foram expressos em nanogramas por grama (ng/g) de fezes e os resultados das concentrações de progestágenos fecais foram expressos em microgramas por grama (ug/g) de fezes. A correspondência nas concentrações de esteróides entre fezes secas e úmidas foi determinada através da análise de correlação. Todas as análises foram realizadas com os programas JMP (*SAS Institute Inc.*, Versão 3.2.2, 1997), Microsoft® Excel 2000 (*Microsoft Corporation*, 1997) e STATISTICA for Windows (*StatSoft Inc.*, Release 5.1 D, 1996).

RESULTADOS

Houve uma boa correspondência entre as concentrações de esteróides em amostras fecais secas *versus* úmidas entre as espécies ($P < 0,05$). As médias globais das correlações foram $r = 0,82$ (variação, $r = 0,73-0,96$) e $r = 0,49$ (variação, $r = 0,30-0,72$) para estrógenos e progestágenos, respectivamente. Os resultados por fêmea foram resumidos na Tabela 1 e podem ser visualizados nas Figuras 1-16.

TABELA 1. Coeficientes de correlação entre amostras fecais secas e úmidas para estrógenos e progestágenos

Animal ^a	Correl. E2 ^b	n	Correl. P4 ^c	n
Lti-1	0,76	104	0,66	104
Lti-2	-	-	0,30	143
Lti-3	0,96	19	-	-
Lpa-1	0,84	145	0,35	145
Lpa-2	0,87	142	0,43	142
Lpa-3	0,76	89	0,63	89
Lpa-8	0,73	62	0,72	62
Lwi-1	0,84	133	0,37	113
Lwi-2	0,79	155	0,45	155
Média global	0,82	106	0,49	119
Mínimo	0,73	19	0,30	62
Máximo	0,96	155	0,72	155

^aLti = *Leopardus tigrinus*; Lpa = *Leopardus pardalis*; Lwi = *Leopardus wiedii*.

^bE2 = estrógenos; ^cP4 = progestágenos.



Análise estatística para o estrógeno

Fêmea de jaguatirica (oc-8): 62 amostras

Correlação entre amostras secas e úmidas para estrógeno = 0,73 ($P < 0,05$)

Testes de Homogeneidade de Variâncias (oc-8(E2).sta)

	Hartley	Cochran	Bartlett		
	F-máx.	C	Qui-quadrado	gl	p
VR	1,041566	0,510180	0,025086	1	0,874154

Resumo de todos os efeitos; esquema: (oc-8(E2).sta)

1-TRAT

	Gl	MS	Gl	MS		
	Efeito	Efeito	Erro	Erro	F	p-nível
1	1	133013,7	122	621459,9	0,214034	0,644448

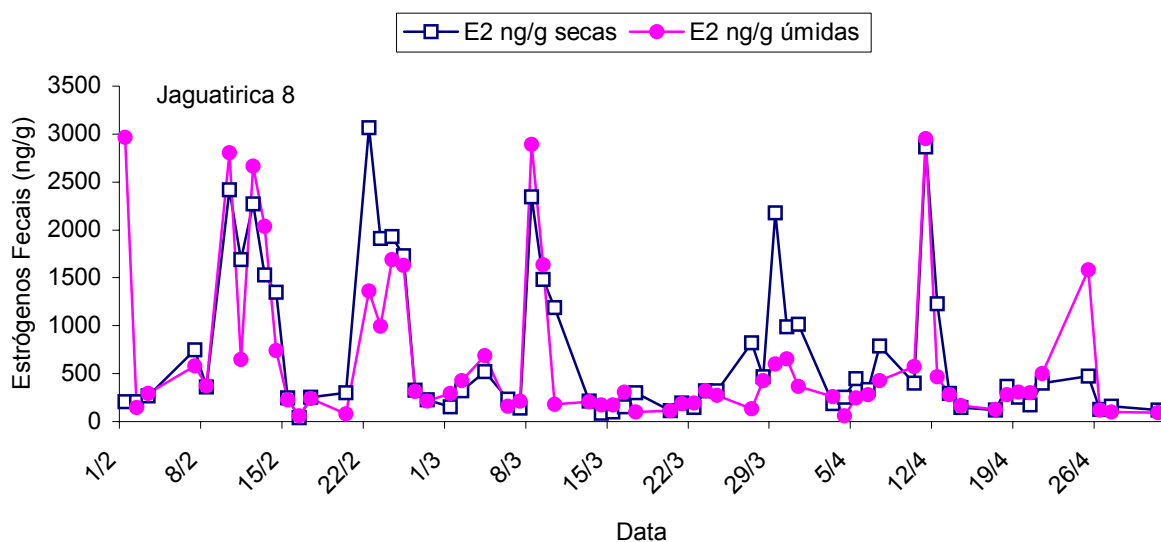


Fig. 1 Perfis da excreção fecal de estrógeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de jaguatirica (*Leopardus pardalis*).



Fêmea de jaguatirica (oc-3): 89 amostras

Correlação entre amostras secas e úmidas para estrógeno = 0,76 ($P < 0,05$)

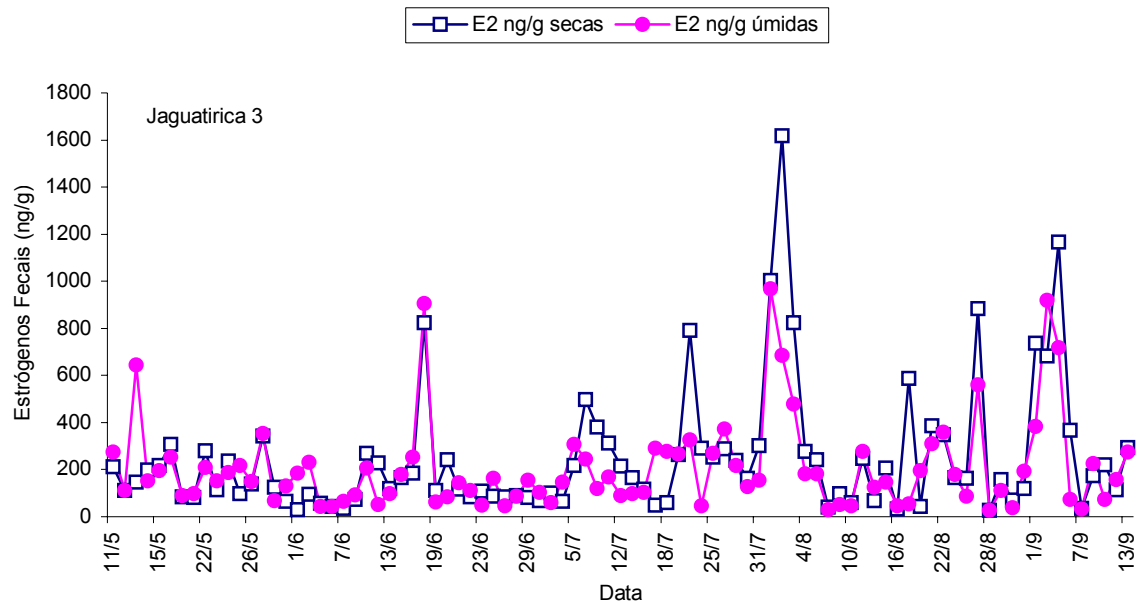


Fig. 2. Perfis da excreção fecal de estrógeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de jaguatirica (*Leopardus pardalis*).



Fêmea de jaguatirica (oc-1): 145 amostras

Correlação entre amostras secas e úmidas para estrógeno = 0,84 ($P < 0,05$)

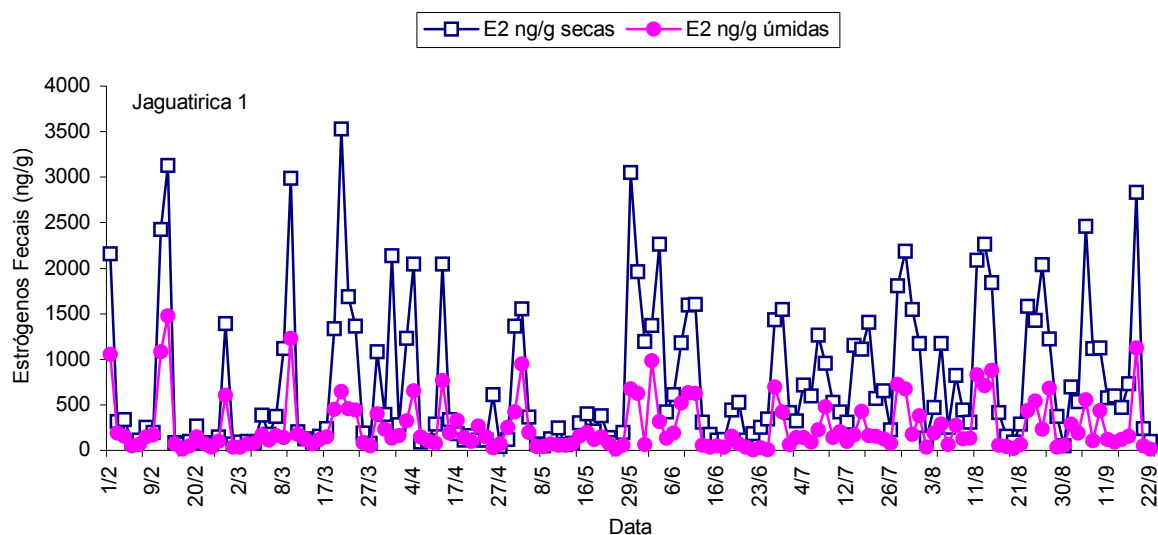


Fig. 3. Perfis da excreção fecal de estrógeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de jaguatirica (*Leopardus pardalis*).



Fêmea de jaguatirica (oc-2): 142 amostras

Correlação entre amostras secas e úmidas para estrógeno = 0,87 ($P < 0,05$)

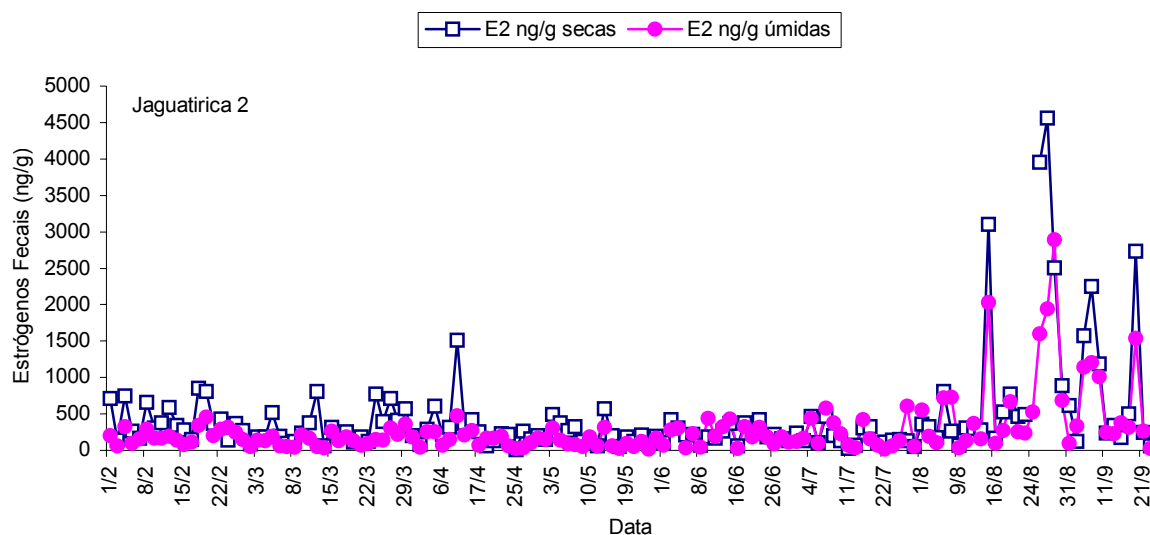


Fig. 4. Perfis da excreção fecal de estrógeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de jaguatirica (*Leopardus pardalis*).



Fêmea de gato-do-mato-pequeno (Lti-1): 104 amostras

Coeficiente de correlação entre amostras secas e úmidas para estrógeno = 0,76 ($P < 0,05$)

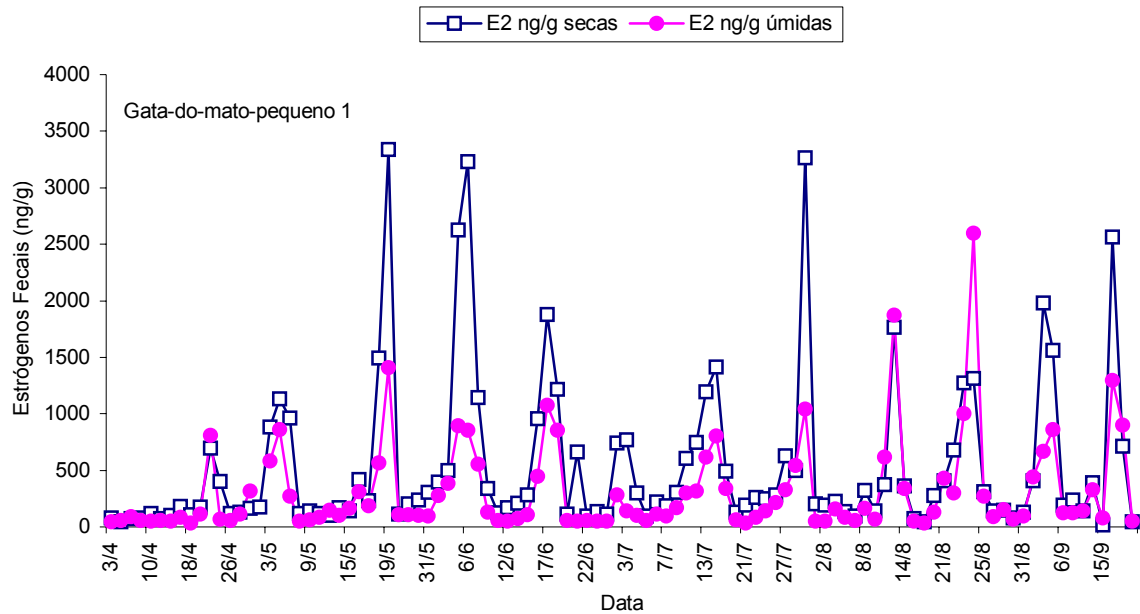


Fig. 5. Perfis da excreção fecal de estrógeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*).



Fêmea de gato-do-mato-pequeno (Lti-3): 19 amostras

Coeficiente de correlação entre amostras secas e úmidas para estrógeno = 0,96 ($P < 0,05$)

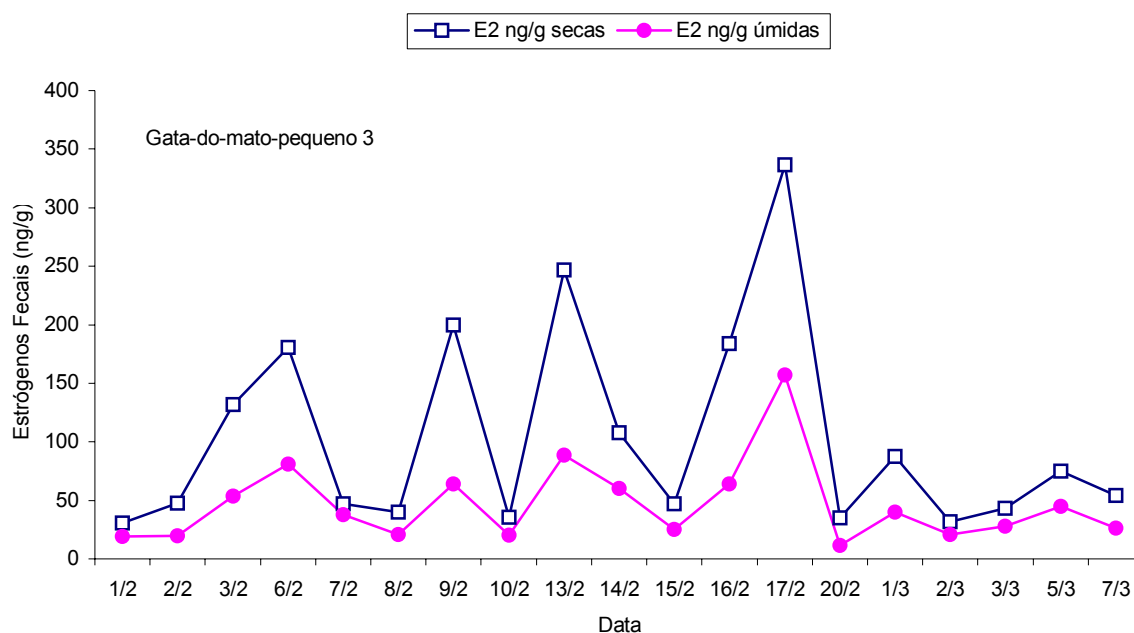


Fig. 6. Perfis da excreção fecal de estrógeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*).



Fêmea de gato-maracajá (Ma-1): 133 amostras

Coeficiente de correlação entre amostras secas e úmidas para estrógeno = 0,84 ($P < 0,05$)

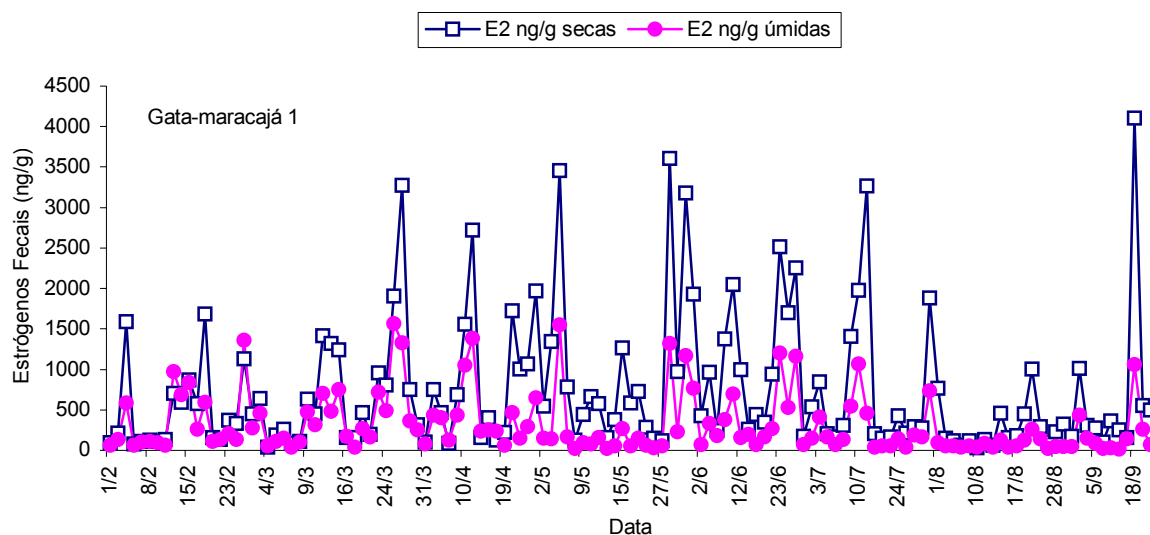


Fig. 7. Perfis da excreção fecal de estrógeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de gato-maracajá (*Leopardus wiedii*).



Fêmea de gato-maracajá (Ma-2): 155 amostras

Coeficiente de correlação entre amostras secas e úmidas para estrógeno = 0,79 ($P < 0,05$)

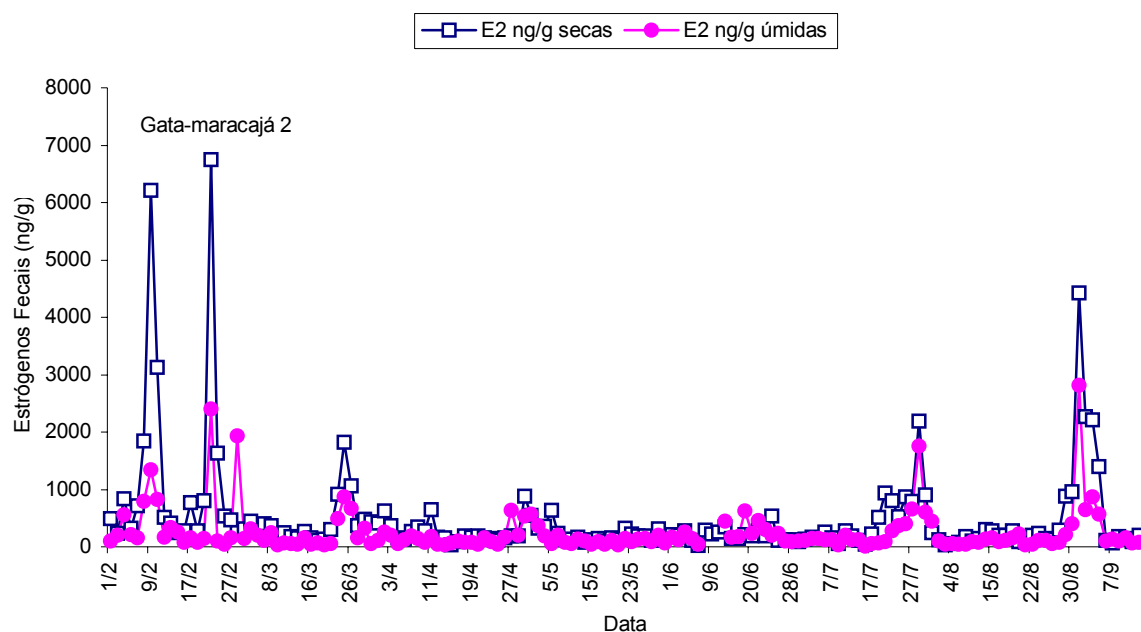


Fig. 8. Perfis da excreção fecal de estrógeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de gato-maracajá (*Leopardus wiedii*).



Análise estatística para o progestágeno

Fêmea de jaguatirica (Lpa-8): 62 amostras

Coeficiente de correlação entre amostras secas e úmidas para progestágeno = 0,72 ($P < 0,05$)

Testes de Homogeneidade de Variâncias (Lpa-8(p4).sta)

	Hartley	Cochran	Bartlett		
	F-máx	C	Qui-quadrado	gl	p
VR	3,957730	0,798295	26,61761	1	0,000000

Testes de Homogeneidade de Variâncias (Lpa-8(p4).sta) = log(VR)

	Hartley	Cochran	Bartlett		
	F-máx	C	Qui-quadrado	gl	p
VAR3	1,466139	0,594508	2,201181	1	0,137915

Resumo de todos os efeitos; esquema: (Lpa-8(p4).sta)

1-TRAT

	gl	MS	gl	MS		
	Efeito	Efeito	Erro	Erro	F	p-nível
1	1	42,59160	122	21,12527	2,016145	0,158184

Resumo de todos os efeitos; esquema: (oc-8(p4).sta) = log(VR)

1-TRAT

	gl	MS	gl	MS		
	Efeito	Efeito	Erro	Erro	F	p-nível
1	1	0,258082	122	0,102886	2,508430	0,115828

Fêmea de jaguatirica (oc-8): 62 amostras

Coeficiente de correlação entre amostras secas e úmidas para progestágeno = 0,72 ($P < 0,05$)

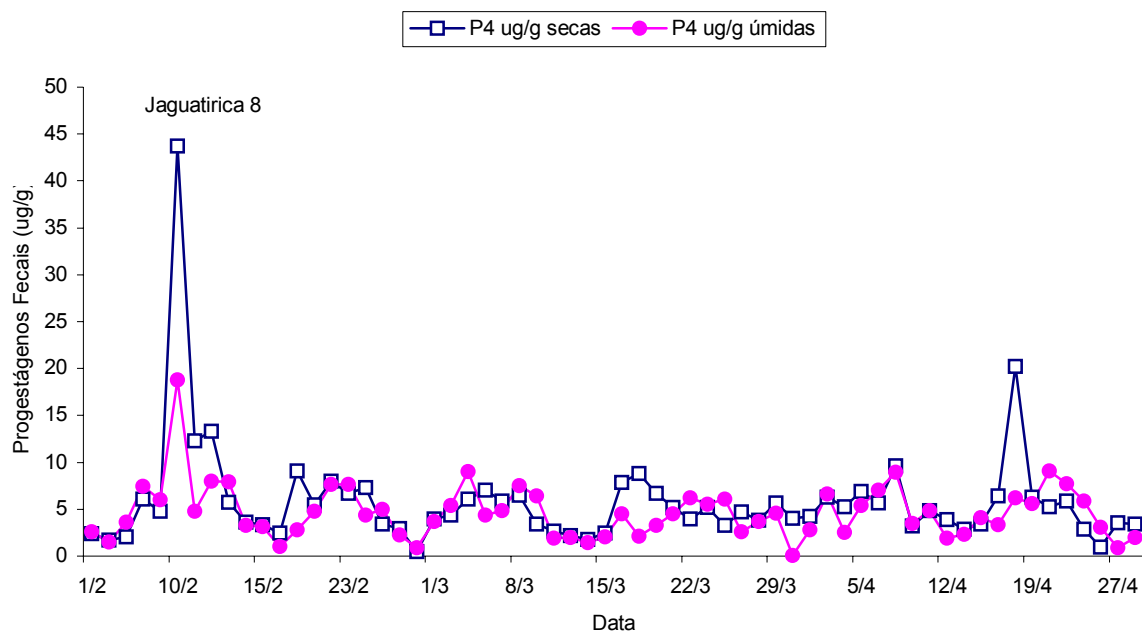


Fig. 9. Perfis da excreção fecal de progestágeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de jaguatirica (*Leopardus pardalis*).



Fêmea de jaguatirica (oc-3): 89 amostras

Correlação entre amostras secas e úmidas para progestágeno = 0,63 ($P < 0,05$)

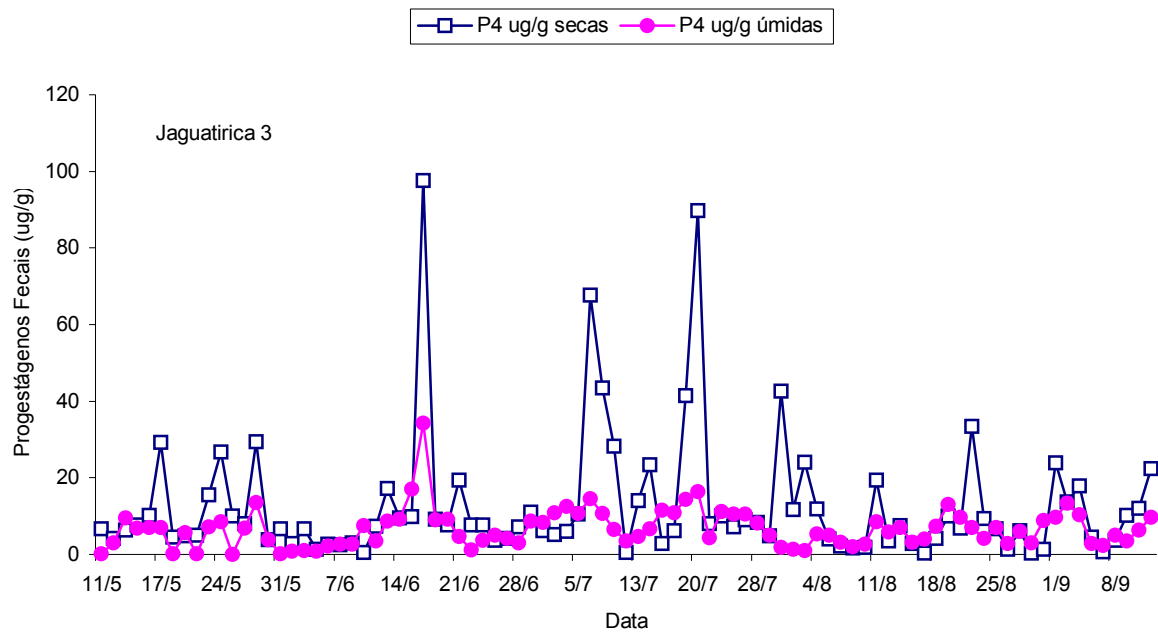


Fig. 10. Perfis da excreção fecal de progestágeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de jaguatirica (*Leopardus pardalis*).



Fêmea de jaguatirica (oc-1): 145 amostras

Correlação entre amostras secas e úmidas para progesterona = 0,35 ($P < 0,05$)

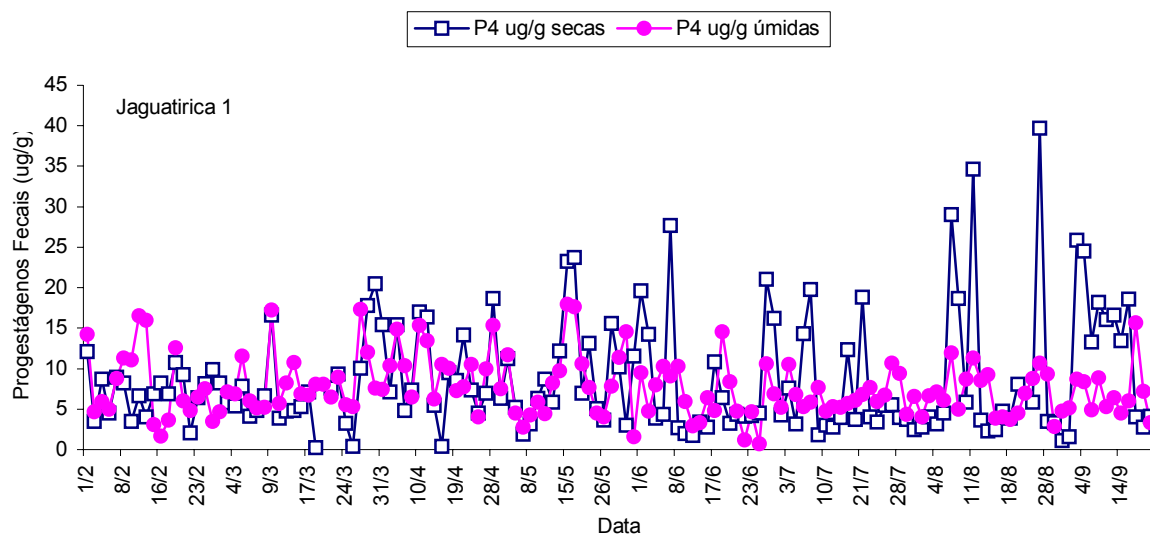


Fig. 11. Perfis da excreção fecal de progesterona utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de jaguatirica (*Leopardus pardalis*).

Fêmea de jaguatirica (oc-2): 142 amostras

Correlação entre amostras secas e úmidas para progesterona = 0,43 ($P < 0,05$)

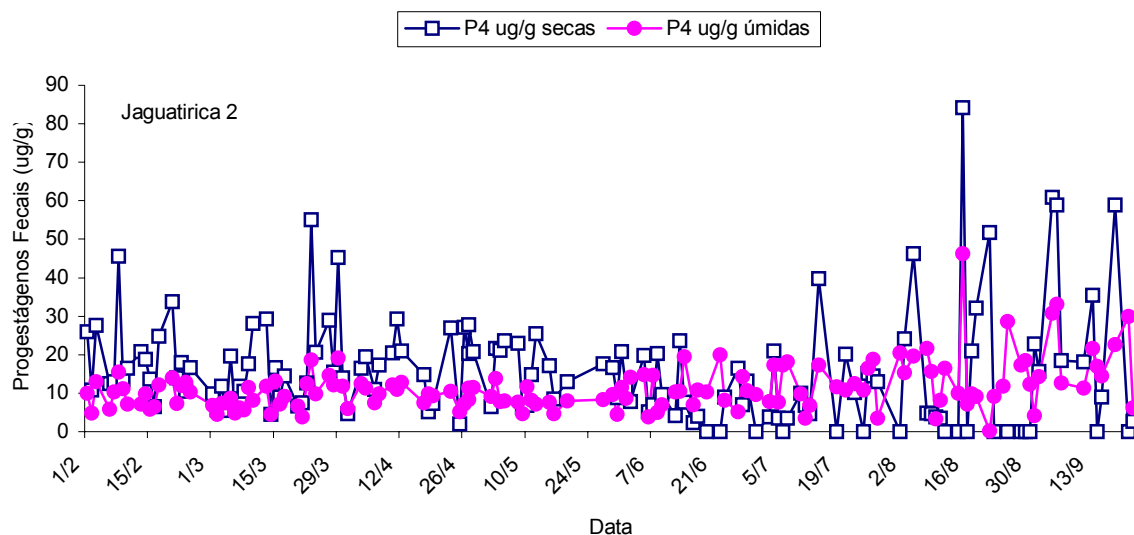


Fig. 12. Perfis da excreção fecal de progesterona utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de jaguatirica (*Leopardus pardalis*).

Fêmea de gato-do-mato-pequeno (Lti-1): 104 amostras

Correlação entre amostras secas e úmidas para progesterona = 0,66 ($P < 0,05$)

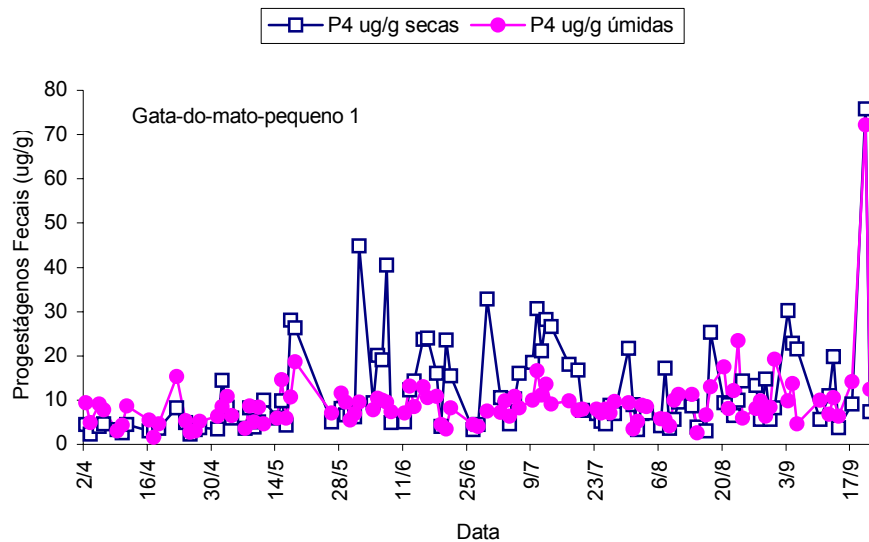


Fig. 13. Perfis da excreção fecal de progesterona utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*).

Fêmea de gato-do-mato-pequeno (Lti-2): 143 amostras

Correlação entre amostras secas e úmidas para progesterona = 0,30 ($P < 0,05$)

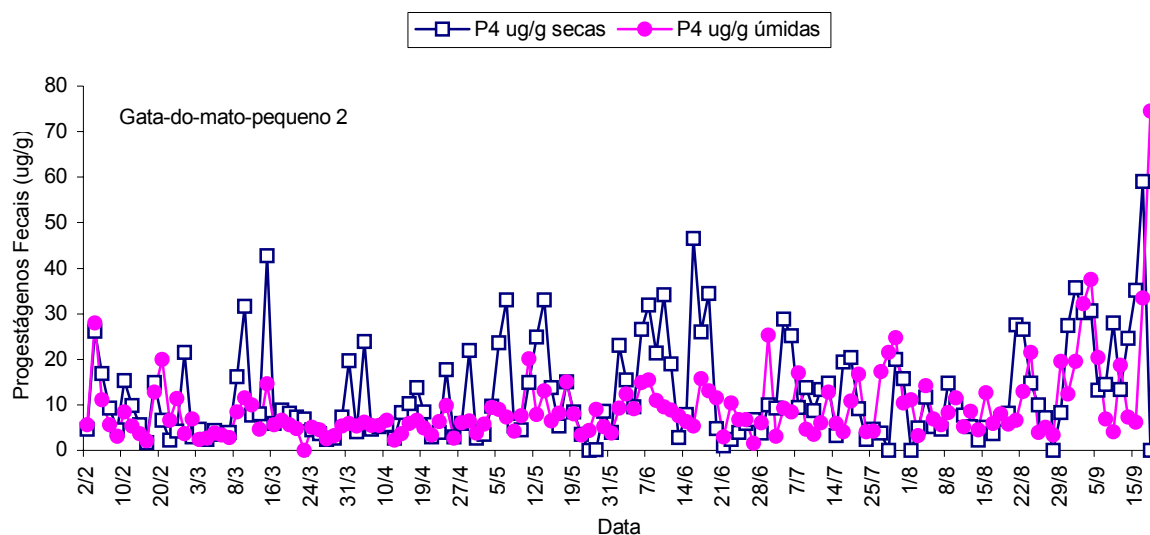


Fig. 14. Perfis da excreção fecal de progesterona utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*).



Fêmea de gato-maracajá (Ma-1): 113 amostras

Coefficiente de correlação entre amostras secas e úmidas para progestágeno = 0,37 ($P < 0,05$)

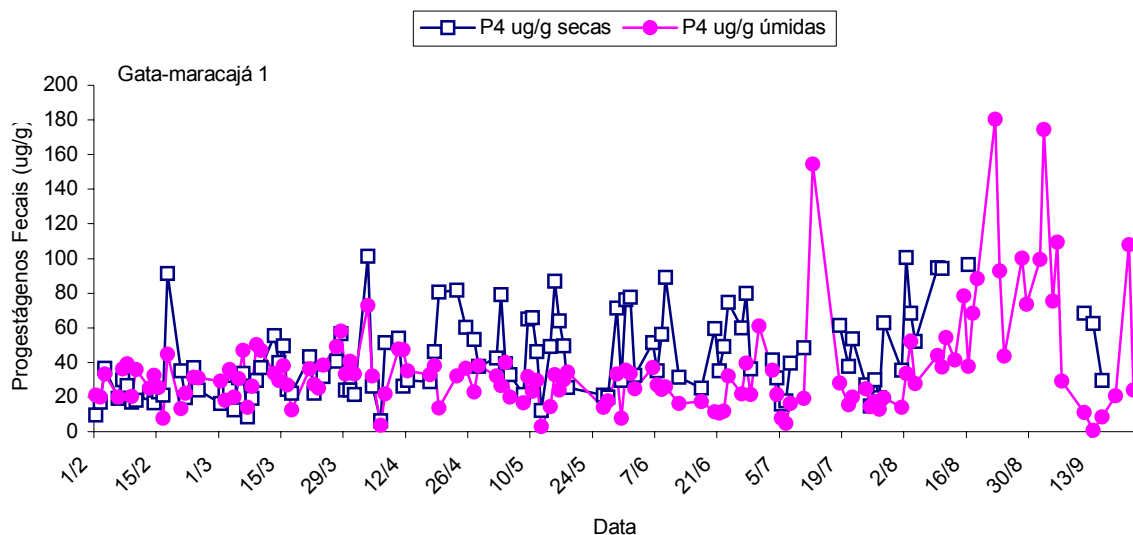


Fig. 15. Perfis da excreção fecal de progestágeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de gato-maracajá (*Leopardus wiedii*).

Fêmea de gato-maracajá (Ma-2): 155 amostras

Coeficiente de correlação entre amostras secas e úmidas para progestágeno = 0,45 ($P < 0,05$)

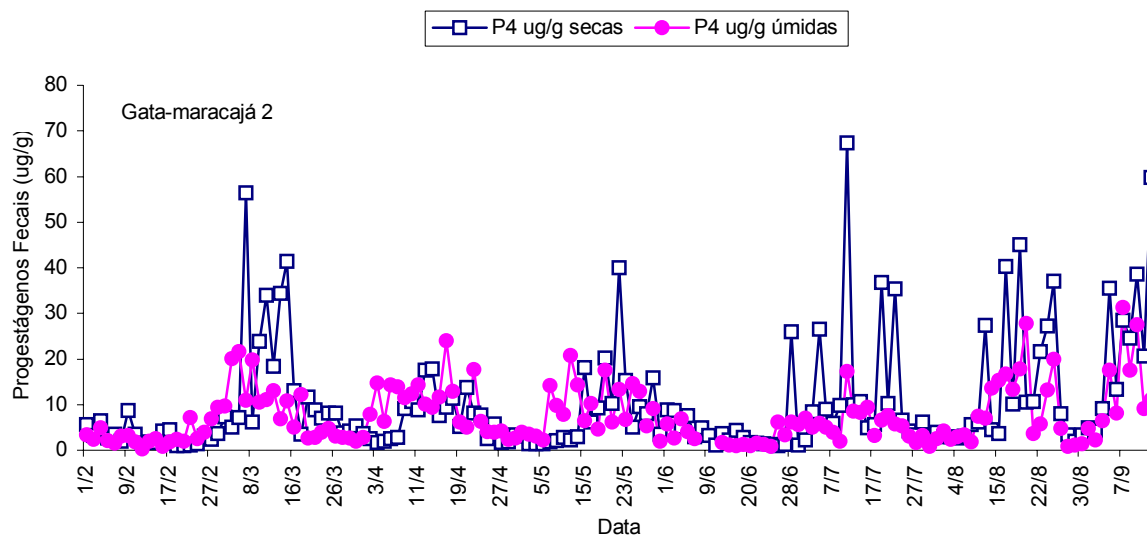


Fig. 16. Perfis da excreção fecal de progestágeno utilizando-se amostras secas (quadrados vazios) e amostras úmidas (círculos preenchidos) em fêmea adulta de gato-maracajá (*Leopardus wiedii*).



Analisando-se os coeficientes de correlação entre amostras secas e úmidas, por espécie, foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 2.

TABELA 2. Coeficientes de correlação entre amostras secas e úmidas, para estrógeno e progestágeno, por espécie

Nome comum	Correlação para Estrógeno (N)	Correlação para Progestágeno (N)
Gato-do-mato-pequeno	0,78 (123) $P < 0,05$	0,43 (247) $P < 0,05$
Jaguaririca	0,71 (438) $P < 0,05$	0,52 (438) $P < 0,05$
Gato-maracajá	0,81 (288) $P < 0,05$	0,68 (268) $P < 0,05$



DISCUSSÃO

Após uma análise global dos resultados, podemos concluir que houve uma boa correspondência ($P < 0,05$) entre as concentrações de esteróides quando comparamos amostras fecais secas *versus* úmidas nessas espécies. Verificamos que houve correlações significantes ($P < 0,05$) tanto para estrógeno como para progestágeno em todos os animais analisados e, conseqüentemente, para as três espécies trabalhadas.

A utilização com sucesso de amostras úmidas para extração de estrógenos e progestágenos também tem sido descrita para outras espécies, como tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) (Patzl et al., 1998).

Através da análise dos gráficos, foram freqüentemente observados valores mais altos para as concentrações hormonais obtidas de fezes secas, o que já era esperado, pois durante seu processamento a água é eliminada. De qualquer forma, os picos de concentrações hormonais foram coincidentes, o que é mais importante na análise visual e qualitativa dos gráficos, do que propriamente os valores absolutos das concentrações hormonais.

Os valores dos coeficientes de correlação foram menores para as análises de progestágenos, quando comparamos amostras secas e úmidas. Porém, na prática, esses valores menores quando comparados aos coeficientes de correlação para estrógeno, não têm grande importância porque os valores medidos foram sempre basais, não alterando dessa forma a interpretação dos gráficos. As correlações foram maiores para estrógenos provavelmente porque as análises apresentaram menor coeficiente de variação intra e inter-ensaio.

A eliminação de uma etapa trabalhosa e que consome muito tempo, permite o processamento das amostras, de uma forma mais fácil, rápida e barata, sem perda da qualidade dos resultados finais. Como os perfis de esteróides foram qualitativamente similares, a análise de amostras úmidas apresenta, em nossa opinião, grandes vantagens, principalmente quando se trabalha com um grande número de amostras dos mesmos indivíduos, com objetivo de avaliações durante longo período.

CONCLUSÕES

1. Análises de amostras fecais secas e úmidas para estrógenos e progestágenos em fêmeas de gato-do-mato-pequeno, jaguatirica e gato-maracajá, indicaram boa correlação entre as metodologias.
2. Como os perfis de esteróides foram qualitativamente similares e a preparação das amostras foi mais rápida e menos custosa, a análise de amostras úmidas apresenta vantagens para estudos de longa duração.
3. A utilização de amostras úmidas é válida para avaliações durante longo período de hormônios esteróides reprodutivos em fêmeas de felídeos do gênero *Leopardus*, sugerindo que esse método possa ser utilizado para outros esteróides, nas demais espécies de felídeos.

REFERÊNCIAS

1. Bamberg, E., Möstl, E., Patzl, M., King, G.J. (1991) Pregnancy diagnosis by enzyme immunoassay of estrogens in feces from nondomestic species. *J. Zoo Wildl. Med.* 22:73-77.
2. Chard, T. (1989) An introduction to radioimmunoassay and related techniques. Elsevier, Amsterdam.
3. Goodrowe, K.L., Walker, S.L., Ryckman, D.P., Mastromonaco, G.F., Hay, M.A., Bateman, H.L. & Waddell, W.T. (2000) Piecing together the puzzle of carnivore reproduction. *Animal Reproduction Science* 60-61:389-403.
4. Lasley, B.L., Kirkpatrick, J.F. (1991) Monitoring ovarian function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. *J. Zoo Wildl. Med.* 22:23-31.
5. Patzl, M., Schwarzenberger, F., Osmann, C., Bamberg, E., Bartmann, W. (1998) Monitoring ovarian cycle and pregnancy in the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) by faecal progestagen and oestrogen analysis. *Animal Reproduction Science* 53:209-219.



2. Hormônios esteróides reprodutivos e atividade ovariana em felídeos do gênero *Leopardus*

RESUMO

Os padrões endócrinos reprodutivos foram caracterizados em fêmeas de jaguatirica (*Leopardus pardalis*; n=3), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*; n=2) e gato-maracajá (*Leopardus wiedii*; n=2) alojadas em cativeiro na Região Sul do Brasil. Essas fêmeas foram mantidas em recintos individuais e expostas às flutuações naturais do fotoperíodo. As alterações cíclicas dos esteróides ovarianos foram monitoradas através da análise de metabólitos de estrógeno e progestágeno em amostras fecais coletadas cinco vezes por semana durante 14 a 18 meses. Com base nos intervalos entre os picos de estrógeno fecal, a duração média (\pm erro padrão) do ciclo estral foi de $18,4 \pm 1,6$ dias para a jaguatirica (variação de 7 a 31 dias), $16,7 \pm 1,3$ dias para o gato-do-mato-pequeno (variação de 11 a 27 dias) e $17,6 \pm 1,5$ dias para o gato-maracajá (variação de 11 a 25 dias, sem considerar as fases luteais). As análises de progestágenos fecais combinadas com duas observações laparoscópicas dos ovários confirmaram que jaguatiricas e gatas-do-mato-pequeno não ovularam espontaneamente. Em contraste, fases luteais não induzidas por cópula com $40,1 \pm 6,3$ dias de duração (variação, 30 a 60 dias) foram observadas freqüentemente em ambas as gatas-maracajá. Não houve evidência de sazonalidade gonadal nas fêmeas de gato-maracajá, tanto na atividade folicular como na luteal. Nas jaguatiricas, alterações cíclicas na excreção de estrógeno foram observadas durante cada mês do ano; entretanto, apenas uma fêmea ciclou continuamente. Nas outras duas jaguatiricas, períodos de anestro com vários meses de duração foram observados. Não foi possível concluir que as fêmeas de gato-do-mato-pequeno não apresentaram sazonalidade, porque a ciclicidade estral foi observada em apenas uma das duas fêmeas. Na fêmea que ciclou, um período de anestro foi observado da metade de outubro até o final de dezembro. Esses dados demonstram similaridades entre as três espécies de felídeos do gênero *Leopardus*, incluindo evidências de que são poliétricas, porém apresentam períodos inexplicáveis de inatividade ovariana. Apenas as gatas-maracajá diferiram, exibindo ovulações espontâneas ocasionais, não induzidas por cópula. Historicamente, essas espécies não têm se reproduzido bem em cativeiro. Contudo, espera-se que



a compreensão das similaridades e diferenças biológicas entre elas, possa conduzir a melhores estratégias de manejo, que resultem um dia em aumento do sucesso reprodutivo.

Palavras-chave: esteróides fecais; estrógenos; progestágenos; monitorização não invasiva; ciclo estral; reprodução; atividade ovariana



ABSTRACT

Reproductive endocrine patterns were characterized in female ocelots (*Leopardus pardalis*; n=3), tigrinas (*Leopardus tigrinus*; n=2), and margays (*Leopardus wiedii*; n=2) housed in captivity in southern Brazil. Females were maintained as singletons and exposed to natural fluctuations in photoperiod. Cyclic changes in ovarian steroids were monitored by analyzing estrogen and progesterone metabolites in fecal samples collected five times weekly for 14 to 18 months. Based on intervals between fecal estrogen peaks, mean (\pm SEM) duration of the estrous cycle was 18.4 ± 1.6 days for the ocelots (range, 7-31 days), 16.7 ± 1.3 days for the tigrinas (range, 11-27 days), and 17.6 ± 1.5 days for the margays (range, 11-25 days; not considering the luteal phases). Fecal progesterone analyses combined with two laparoscopic observations of the ovaries confirmed that ocelots and tigrinas did not ovulate spontaneously. In contrast, non-mating-induced luteal phases of 40.1 ± 6.3 days in duration (range, 30-60 days) were observed frequently in both margays. There was no evidence of gonadal seasonality in margays in either follicular or luteal activity. In ocelots, cyclic changes in estrogen excretion were observed during each month of the year; however, only one female cycled continuously. In the other two ocelots, periods of acyclicity of several months' duration were observed. It was not possible to conclude whether tigrinas were aseasonal because estrous cyclicity was observed in only one of two individuals. In the female that cycled, a period of acyclicity was observed from mid-October to late December. These data demonstrate similarities among three felid species of the genus *Leopardus*, including evidence they are polyestrous but experience unexplained periods of ovarian inactivity. Only the margays differed by exhibiting occasional spontaneous, non-mating-induced ovulations. Historically, these species have not bred well in captivity. However, it is hoped that understanding the biological similarities and differences among them could lead to improved management strategies that may one day result in increased reproductive success.

Key words: fecal steroids; estrogens; progesterones; non-invasive monitoring; estrous cycle; reproduction; ovarian activity



INTRODUÇÃO

A maioria das 36 espécies de felídeos não domésticos está ameaçada ou em perigo, em pelo menos alguma porção de sua área de ocorrência natural, devido à fragmentação de hábitat, caça e poluição (CITES, 1973). Espécies que habitam áreas de floresta tropical úmida, onde o desmatamento é intenso, estão particularmente vulneráveis. Nas florestas tropicais úmidas do Brasil, a jaguatirica (*Leopardus pardalis*), o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e o gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) estão entre os felídeos que lutam para sobreviver em face do declínio dos habitats.

A fisiologia reprodutiva da maioria dos felídeos silvestres de pequeno tamanho não tem sido estudada, especialmente das espécies neotropicais. Essa falta de informação básica tem dificultado esforços para aumentar a reprodução em cativeiro, usando monta natural ou técnicas de reprodução assistida, como inseminação artificial e transferência de embriões. Portanto, torna-se importante obter informações sobre os eventos hormonais associados com o ciclo estral, para auxiliar esforços na recuperação dos níveis populacionais das referidas espécies. O valor da monitorização de esteróides fecais está agora bem estabelecido para caracterizar eventos reprodutivos em felídeos [Brown & Wildt, 1997; Brown et al., no prelo], incluindo a identificação do modo de ovulação (induzida *versus* espontânea) e flutuações na atividade reprodutiva sazonal.

O objetivo deste estudo foi começar a desenvolver uma base de dados sobre as características do ciclo reprodutivo, baseadas em análises de estrógeno e progestágeno fecais para gato-do-mato-pequeno, jaguatirica e gato-maracajá. Essas espécies foram selecionadas porque estão todas categorizadas como ameaçadas e estão declinando em número, não só no Brasil como também ao longo de suas outras áreas de ocorrência na América Central e do Sul (Oliveira, 1994). O sucesso reprodutivo em todas essas espécies também é baixo em cativeiro e estratégias melhoradas de reprodução são necessárias para sustentar os números sem recorrer à captura de indivíduos na natureza.



MÉTODOS

Animais e Colheita de Amostras Fecais

Os animais estudados foram fêmeas adultas de jaguatirica ($n = 3$), gato-do-mato-pequeno ($n = 2$) e gato-maracajá ($n = 2$). Identificação individual, designação, idade estimada, peso corporal, categoria reprodutiva e local da instituição são apresentados na Tabela 1. Cada fêmea foi categorizada como procriadora caso tivesse produzido filhote previamente; não procriadora, caso não tivesse parido após ter sido colocada com um macho no mínimo uma ocasião; ou não determinada, caso seu histórico reprodutivo fosse desconhecido. Todas eram provenientes da natureza, exceto a fêmea de gato-do-mato-pequeno 2. As idades das fêmeas provenientes da natureza são estimativas baseadas no número de anos em cativeiro no início da coleta de dados.

Os animais estavam alojados individualmente no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB) e no Zoológico de Curitiba. Os recintos no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional eram maiores (comprimento X largura X altura: 6,92 X 2,87 X 2,55 m para gato-do-mato-pequeno e jaguatirica; 7,00 X 2,95 X 4,15 m para gato-maracajá) do que os de Curitiba (2,90 X 2,60 X 2,00 m). Todos os recintos possuíam troncos e um local para esconderijo (cambiamento ou caixa). Nessas instituições todas as fêmeas estavam em contato olfativo e auditivo com machos coespecíficos. O Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional está localizado na cidade de Foz do Iguaçu (altitude: 173 m; 25°32'45" S; 54°35'07" W) e o Zoológico na cidade de Curitiba (altitude: 908 m; 25°25'48" S; 49°16'15" W). As coordenadas de ambas as instituições representam a extensão sul aproximada da área de ocorrência natural de cada espécie estudada. Ferreira [1996] descreveu o clima para essas duas localizações. Em Foz do Iguaçu é subtropical úmido, com verões quentes e com aumento de chuvas; as geadas no inverno ocorrem com pouca frequência. A pluviosidade anual está acima de 1700 mm e não há estação seca, a umidade relativa está em entre 80-90%, a média anual de temperatura é de 21°C (15°C no inverno, 25°C no verão) e durante o verão as temperaturas máximas podem exceder 42°C [WHN, 1983]. Em Curitiba o clima é subtropical úmido mesotérmico, mais frio do que em Foz do



Iguaçu, com verões quentes e geadas pouco frequentes, com tendência de concentração de chuvas nos meses de verão, sem estação seca definida. A média das temperaturas dos meses mais quentes é superior a 22°C, e a dos meses mais frios é inferior a 18°C [Ferreira, 1996]. As fêmeas foram mantidas sob fotoperíodo natural e com uma dieta constituída por carne bovina crua, suplemento mineral e vitamínico e água à vontade (ver ANEXOS). Todos os animais foram alimentados uma vez por dia, sem dia de jejum.

TABELA 1. Informação geral sobre as fêmeas de jaguatirica, gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá utilizadas neste estudo

Identificação individual	Designação	Idade (anos)	Peso corporal (kg) ^a	Categoria reprodutiva ^b	Cidade
Lpa-778	Jaguaririca 1	> 4	9,0/9,4	P	Foz do Iguaçu
Lpa-1345	Jaguaririca 2	> 1	9,0/10,0	N	Foz do Iguaçu
Lpa-10	Jaguaririca 3	> 1	8,5/8,0	ND	Curitiba
Lti-1460	Gata-do-mato-pequeno 1	ND	1,9/2,0	ND	Foz do Iguaçu
Lti-1058	Gata-do-mato-pequeno 2	2,5	2,5/2,7	P	Foz do Iguaçu
Lwi-595	Gata-maracajá 1	> 4	4,4/4,3	ND	Foz do Iguaçu
Lwi-04	Gata-maracajá 2	> 3	2,8/2,8	ND	Curitiba

^aDurante a primeira e a segunda laparoscopia, respectivamente.

^bP, procriadora; N, não procriadora; ND, não determinada.

Amostras fecais para análise hormonal foram coletadas de cada fêmea 5 dias por semana durante 14 a 18 meses. Durante todo o estudo foi coletado o bolo fecal inteiro. Comportamentos de estro (como se esfregar contra objetos, vocalizar, rolar, borriar urina com maior frequência, cheirar e assumir a postura de lordose) observados durante os



procedimentos de rotina foram registrados diariamente. Após a colheita, as amostras fecais foram colocadas em sacos plásticos tipo “zip” e imediatamente congeladas e armazenadas (-20°C), até o subsequente transporte em gelo seco para o Laboratório de Endocrinologia do *Smithsonian Institution - Conservation and Research Center*, onde foram analisadas.

Laparoscopia e Citologia Vaginal

Em cada fêmea foram realizadas duas laparoscopias (setembro e abril) para determinar número e tamanho de folículos ovarianos, corpo lúteo (CL) e diâmetro uterino. A avaliação laparoscópica do trato reprodutivo foi realizada como previamente descrita [Wildt et al., 1977; Wildt, 1980; Wildt & Seager, 1980]. A anestesia foi induzida por injeção intramuscular de hidrocloreto de cetamina (22 mg/kg para jaguatirica, 30 mg/kg para gato-do-mato-pequeno e 17 mg/kg para gato-maracajá; *Ketaset, Fort Dodge Laboratories, Inc.*, Fort Dodge, IA) e xilazina (0,8 mg/kg para gato-do-mato-pequeno e 0,3 mg/kg para gato-maracajá, *Rompun, Mobay Corp.*, Shawnee, KS). A xilazina não foi utilizada para as jaguatiricas porque uma anestesia estável foi obtida apenas com o uso de cetamina. Após a indução, um plano cirúrgico de anestesia foi mantido com 1-2% de halotano ou, em dois procedimentos laparoscópicos, com 1-2% de isoflurano. Os ovários foram visualizados diretamente através de um endoscópio rígido com 7 mm de diâmetro inserido na cavidade peritonial através de uma cânula de 10 mm colocada médio-ventralmente (Fig. 1). Uma agulha de Verres inserida através da parede abdominal foi utilizada para manipular o ovário, dessa forma permitindo o exame de todos os aspectos dos ovários e a determinação do número de folículos e CL (Figs. 2 e 3). Devido ao diâmetro da ponta da agulha de Verres ser conhecido, também foi possível mensurar o diâmetro dos folículos, CL e cornos uterinos. Após a laparoscopia, as fêmeas receberam uma injeção profilática intramuscular de penicilina (90.000 UI para jaguatirica, 15.000 UI para gato-do-mato-pequeno e 25.000 UI para gato-maracajá, *Flo-cillin*, penicilina G benzatina e penicilina G procaína, *Fort Dodge Laboratories*).

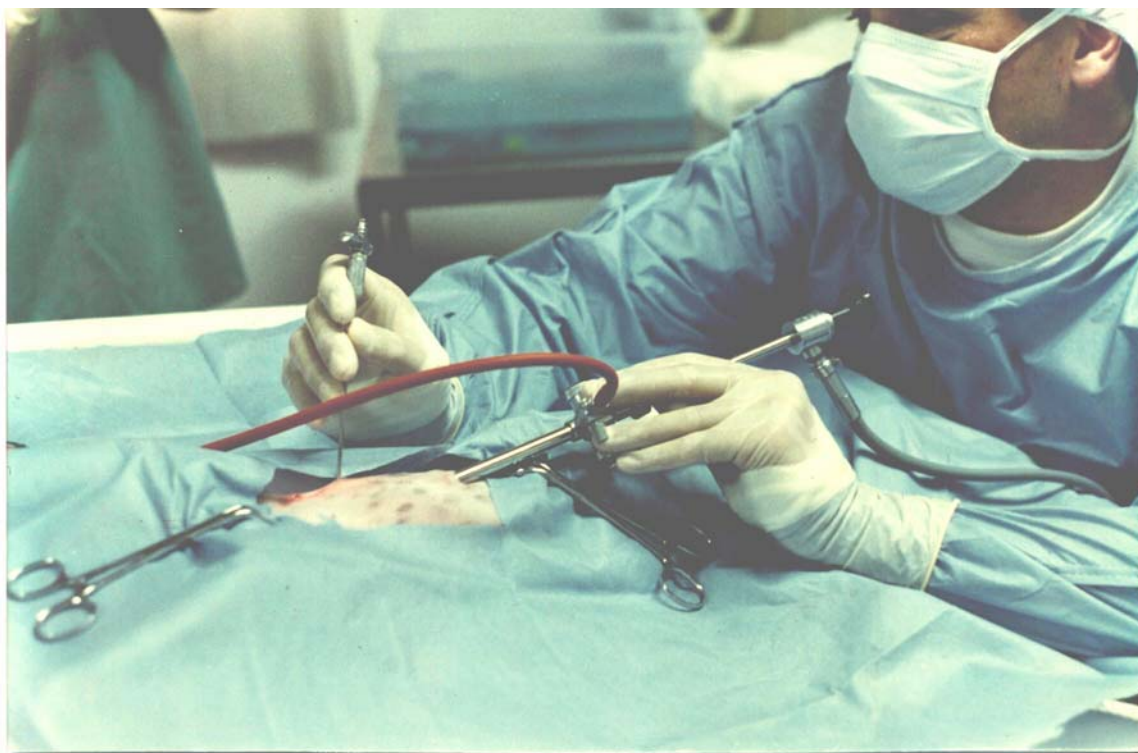


Fig. 1. Laparoscopia em fêmea de felídeo silvestre, realizada no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional.



Fig. 2. Exame e mensuração de útero e ovários, com auxílio da agulha de Verres, durante laparoscopia em felídeo silvestre; realizada no CASIB.

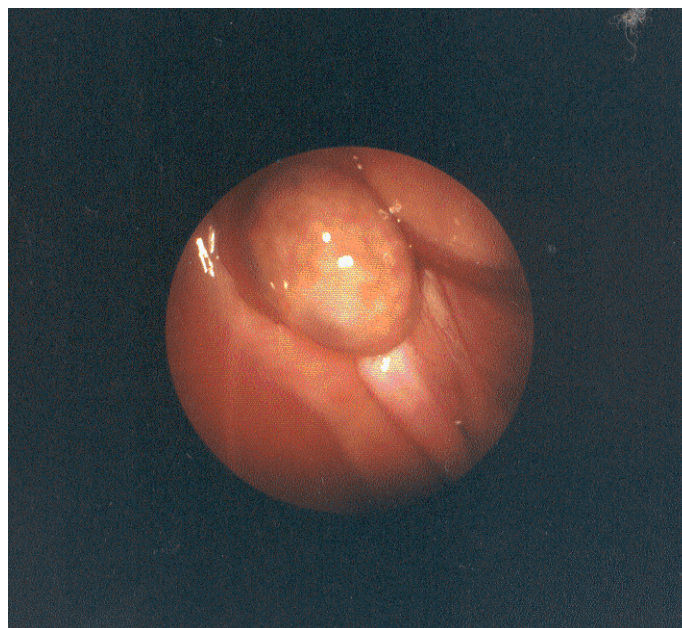


Fig. 3. Ovário e ápice do corno uterino de jaguatirica, visualizados através do laparoscópio.

No momento da laparoscopia, foram realizados esfregaços vaginais utilizando-se *swabs* estéreis, previamente imersos em solução salina (Fig. 4). Os esfregaços foram fixados com *spray* fixador para cabelos, corados com o método de coloração de Schorr [Oba, 1979] modificado (ver ANEXOS) e observados em microscópio ótico com aumento de 400 X para caracterizar a morfologia das células epiteliais. Para cada exame, 100 células foram contadas em duplicata e classificadas com base na morfologia, coloração e tamanho do núcleo como: superficial (cornificada), intermediária ou basal.



Fig. 4. Colheita de material para esfregaço vaginal em fêmea de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional.



Extração de Esteróides e Radioimunoensaio

As amostras fecais foram analisadas para metabólitos de estrógeno e progestágeno de acordo com o método descrito por Brown et al. [1994], exceto que as amostras não foram secas antes da análise (ver capítulo 1). Uma comparação foi feita entre as análises de esteróides conduzidas em amostras fecais secas *versus* úmidas, para os primeiros 5 a 9 meses do estudo. Para análise em peso úmido, as amostras foram descongeladas e bem misturadas antes da extração de esteróide. Após a remoção das alíquotas para análise em peso úmido, as amostras fecais remanescentes foram liofilizadas e pulverizadas por esmagamento para análise em peso seco. Os esteróides foram extraídos através da fervura de aproximadamente 0,5 g de fezes úmidas ou aproximadamente 0,2 g de pó fecal seco em 5 ml de etanol aquoso (90%) durante 20 min. Após centrifugação a 500g durante 10 min, o sobrenadante foi recuperado e o pélete ressuspensionado em 5 ml de etanol 90%, turbilhonado ("vortex") por 1 min e re-centrifugado. Os sobrenadantes de etanol foram combinados, evaporados completamente, dissolvidos em 1 ml de metanol e diluídos em solução salina-fosfato tamponada (0,01 mol/L fosfato, 0,14 mol/L NaCl, 0,5% albumina sérica bovina, 0,01% NaN₃) antes da análise. Os radioimunoensaios foram validados para cada espécie através da demonstração: 1) paralelismo entre as curvas de inibição de ligação das diluições de extrato fecal e o padrão de esteróide apropriado; e 2) recuperação significativa (> 90%) do esteróide exógeno adicionado aos extratos fecais (Fig. 5). A eficiência da extração de esteróides variou de 90 a 100% como determinado pela recuperação de ³H-estradiol e ¹⁴C-progesterona adicionados às fezes antes da extração.



Fig. 5. Contador β utilizado para dosagem de estradiol por radioimunoensaio.

O ensaio de estradiol utilizou um anti-soro anti-estradiol-17 β , um “rótulo” de ^3H -estradiol-17 β e padrões de estradiol. A dose mínima detectável baseada em 90% de ligação máxima foi 1 μg /tubo. Metabólitos de progestágeno foram quantificados utilizando-se um anti-soro anti-progesterona monoclonal (#331), um marcador de ^{125}I -progesterona e padrões de progesterona. A sensibilidade do ensaio foi de 5 μg /tubo. Os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio para ambos os ensaios foram menores que 10%. Todas as concentrações hormonais fecais estão expressas baseadas em grama de peso fecal úmido.



Avaliação dos Dados

Para cada fêmea foi realizado um processo iterativo em que os valores que excediam a média mais 1,5 desvios padrões (SD) foram excluídos. Os valores basais foram determinados após todos estes valores altos terem sido excluídos. O valor mais alto dentro de um grupo de concentrações altas (maiores que a média mais 1,5 SD) foi considerado como pico [Brown et al., 1996]. A duração do ciclo estral foi calculada como o número de dias entre picos nas concentrações de estrógeno (presumidos estarem associados com estro) por períodos não excedentes a 40 dias ou seja, superiores a duas vezes a duração estimada para o ciclo estral da jaguatirica [Mellen, 1989]; e do gato-maracajá [Petersen, 1977; Fagen & Wiley, 1978; Pantiff & Anderson, 1980; Mellen, 1989]. Intervalos entre picos de estrógeno superiores a 40 dias foram considerados como períodos de anestro. A duração do estro foi calculada com base no número de dias em que os estrógenos estavam elevados acima do nível basal. As concentrações basais de metabólitos de progestágeno foram calculadas pelo mesmo processo iterativo, os aumentos pós-ovulatórios foram considerados significantes se os valores excediam a média mais 2 SD dos valores precedentes e permaneciam elevados durante no mínimo uma semana. O uso de 2 SD na análise de progestágeno resultou em uma estimativa mais relevante biologicamente quando comparada com a utilização de 1,5 SD. Para o gato-maracajá, picos de estrógeno separados por fases luteais não foram incluídos no cálculo da duração do ciclo estral.

Os valores são apresentados como média \pm SEM (erro padrão da média). Embora as médias tenham sido calculadas, devido ao baixo número de animais ($n = 2$ para gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá), os dados foram comparados de modo descritivo e estatisticamente. Médias hormonais semanais foram calculadas para cada fêmea e então recalculadas para fornecer as respectivas médias de espécie. Para avaliar influências sazonais e diferenças entre espécies, os dados foram normalizados através da aplicação de um logaritmo (base 10) e testados para normalidade. O teste Shapiro-Wilk W foi utilizado quando o número de amostras foi inferior a 2.000 e o teste Kolmogorov-Smirnov (KSL) quando o número de amostras foi superior a 2.000. O teste Shapiro-Wilk W foi escolhido devido às suas boas propriedades de potência quando comparado a uma grande amplitude de testes alternativos. Quando o valor de P foi menor que 0,05; a distribuição não foi considerada normal. Para avaliar a sazonalidade, as médias de estrógeno por espécie e para cada fêmea

Nei Moreira



foram calculadas por estação da seguinte forma: verão (janeiro - março), outono (abril - junho), inverno (julho - setembro) e primavera (outubro - dezembro). As comparações estatísticas foram testadas utilizando-se análise de variância *one-way* (ANOVA) seguida por comparações. Comparações entre as médias foram testadas utilizando-se o teste de Tukey-Kramer HSD (*honestly significant difference*), com $\alpha = 0,05$. Todas as análises foram realizadas com os programas JMP (*SAS Institute Inc.*, Versão 3.2.2, 1997), Microsoft® Excel 2000 (*Microsoft Corporation*, 1997) e STATISTICA for Windows (*StatSoft Inc.*, Release 5.1 D, 1996).



RESULTADOS

Nenhuma das fêmeas mostrou sinais comportamentais evidentes regulares de receptividade sexual. Apenas as jaguatiricas mostraram ocasionalmente indicadores de estro (que são válidos para felídeos de forma geral), como se esfregar contra objetos, vocalizar, rolar, borrifar urina ou farejar com maior frequência e, em cada caso, houve um aumento concomitante nos estrógenos fecais. O seguinte número de amostras foi analisado por espécie: 619 para gato-maracajá, 887 para jaguatirica e 571 para gato-do-mato-pequeno. Os perfis de metabólitos de estrógeno e progestágeno excretados em fezes úmidas para jaguatirica, gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá estão apresentados nas Figuras 6, 7 e 8, respectivamente. A Figura 9 apresenta dados de um indivíduo de cada espécie durante um período de 4,5 meses, para mostrar mais claramente as flutuações diárias nas concentrações de esteróides fecais. A duração do ciclo estral, baseada no intervalo entre picos consecutivos de estrógeno, foi de $18,4 \pm 1,6$ dias para jaguatiricas (variação de 7 a 51 dias), $16,7 \pm 1,3$ dias para fêmeas de gato-do-mato-pequeno (variação de 11 a 27 dias) e $17,8 \pm 1,9$ dias para gato-maracajá (variação de 11 a 39 dias). A duração do estro (i.e., o número de dias de estrógeno fecal elevado) variou de 1 a 6 dias e pareceu similar entre as espécies. Durante a primeira série de laparoscopias em setembro, foram observados folículos (~2-7 mm de diâmetro) nos ovários de todas as fêmeas (um a quatro por fêmea). Sete meses mais tarde, em abril, folículos (um a oito por fêmea) foram observados em duas das três jaguatiricas, uma das duas gatas-do-mato-pequeno e duas das duas gatas-maracajá (Tabela 2). Um ou dois CLs (corpos lúteos) funcionais (i.e., CLs associados com progestágenos fecais elevados) foram observados em uma de duas gatas-maracajá em setembro e em duas das duas gatas-maracajá em abril. Nenhum CL (ou evidência de cicatriz luteal) foi observado em fêmea de jaguatirica ou gato-do-mato-pequeno na laparoscopia.

Com base na citologia vaginal realizada no período da laparoscopia, a coloração de Schorr apresentou bons resultados para avaliação do ciclo estral. Anestro (presença de CL ou ausência de folículos) foi caracterizado por uma prevalência de células basais ou intermediárias (>70%), ao passo que células com núcleos picnóticos ou células anucleadas foram mais prevalentes (>80%), durante a fase folicular (ausência de CL e presença de folículos). A presença de leucócitos em esfregaços vaginais parece ser comum e



foi também descrita para jaguatiricas (Tebet, 1999). Os valores dos esteróides fecais corresponderam com as observações laparoscópicas e com os resultados da citologia vaginal; os estrógenos fecais foram superiores a 50% acima das concentrações basais individuais durante a fase folicular e estiveram na linha basal durante o anestro. Nas gatas-maracajá com CL, os progestágenos fecais estiveram elevados acima da linha basal.

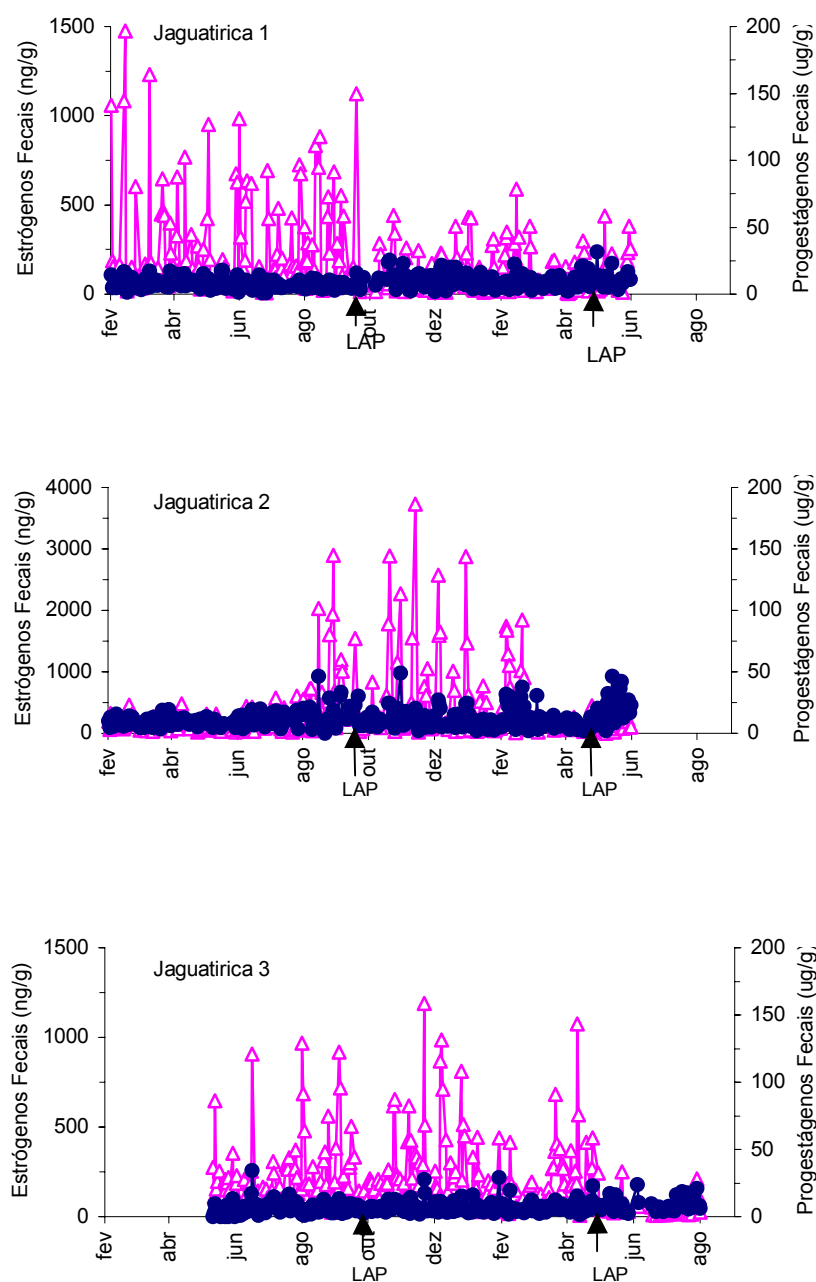


Fig. 6. Perfis da excreção fecal de estrógeno (triângulos vazios) e progestágeno (círculos preenchidos) em fêmeas de jaguatirica alojadas individualmente no Criadouro da Itaipu Binacional (jaguatiricas 1 e 2) e no Zoológico de Curitiba (jaguatirica 3). As setas indicam o momento da laparoscopia. Note as diferenças do eixo y nos valores máximos de estrógenos fecais entre indivíduos.

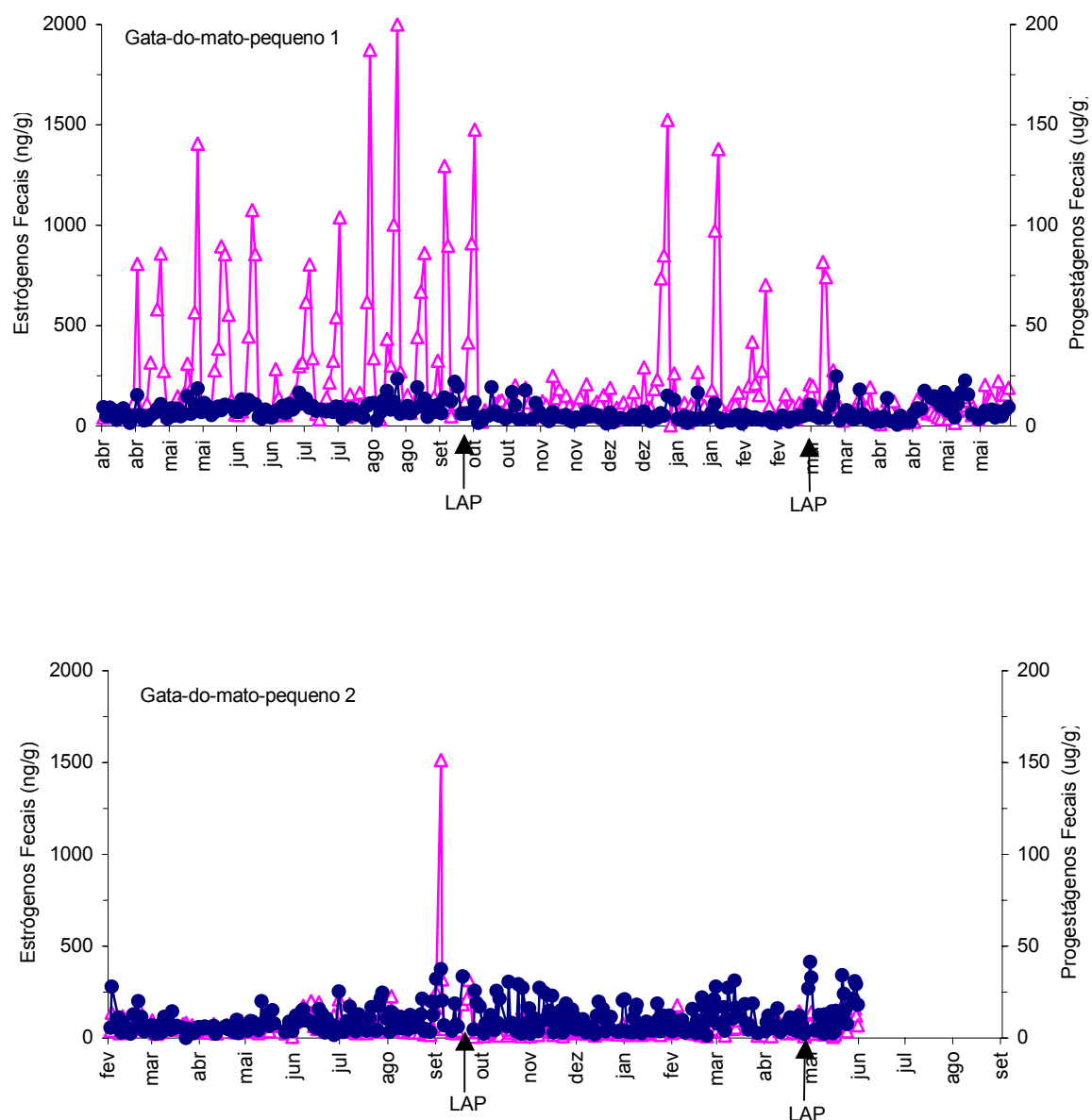


Fig. 7. Perfis da excreção fecal de estrógeno (triângulos vazios) e progestágeno (círculos preenchidos) em fêmeas adultas de gato-do-mato-pequeno alojadas individualmente no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional. As setas indicam o momento da laparoscopia.

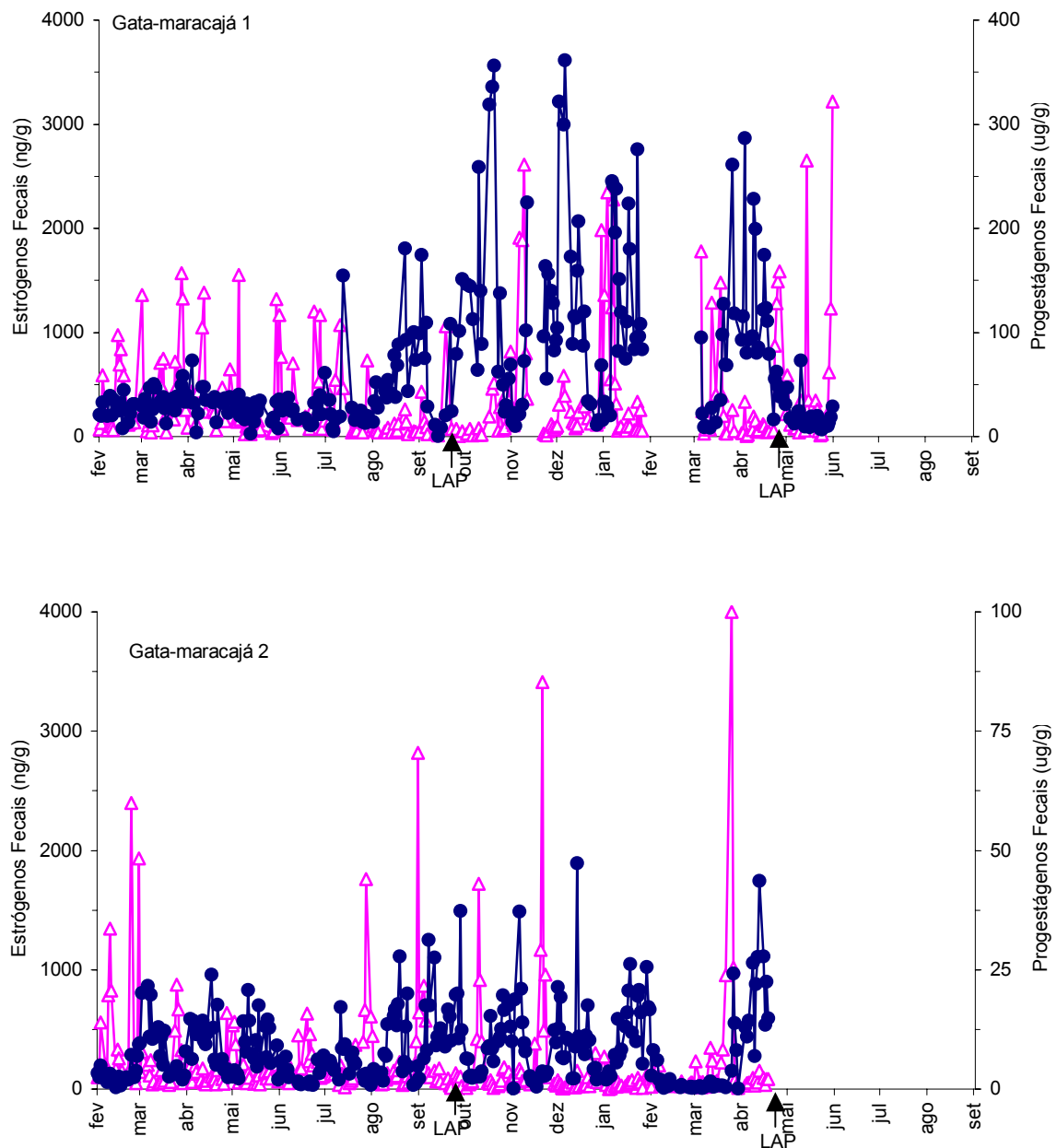


Fig. 8. Perfis da excreção fecal de estrógeno (triângulos vazios) e progestágeno (círculos preenchidos) em fêmeas adultas de gato-maracajá alojadas individualmente no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (gata-maracajá 1) e no Zoológico de Curitiba (gata-maracajá 2). As setas indicam o momento da laparoscopia.

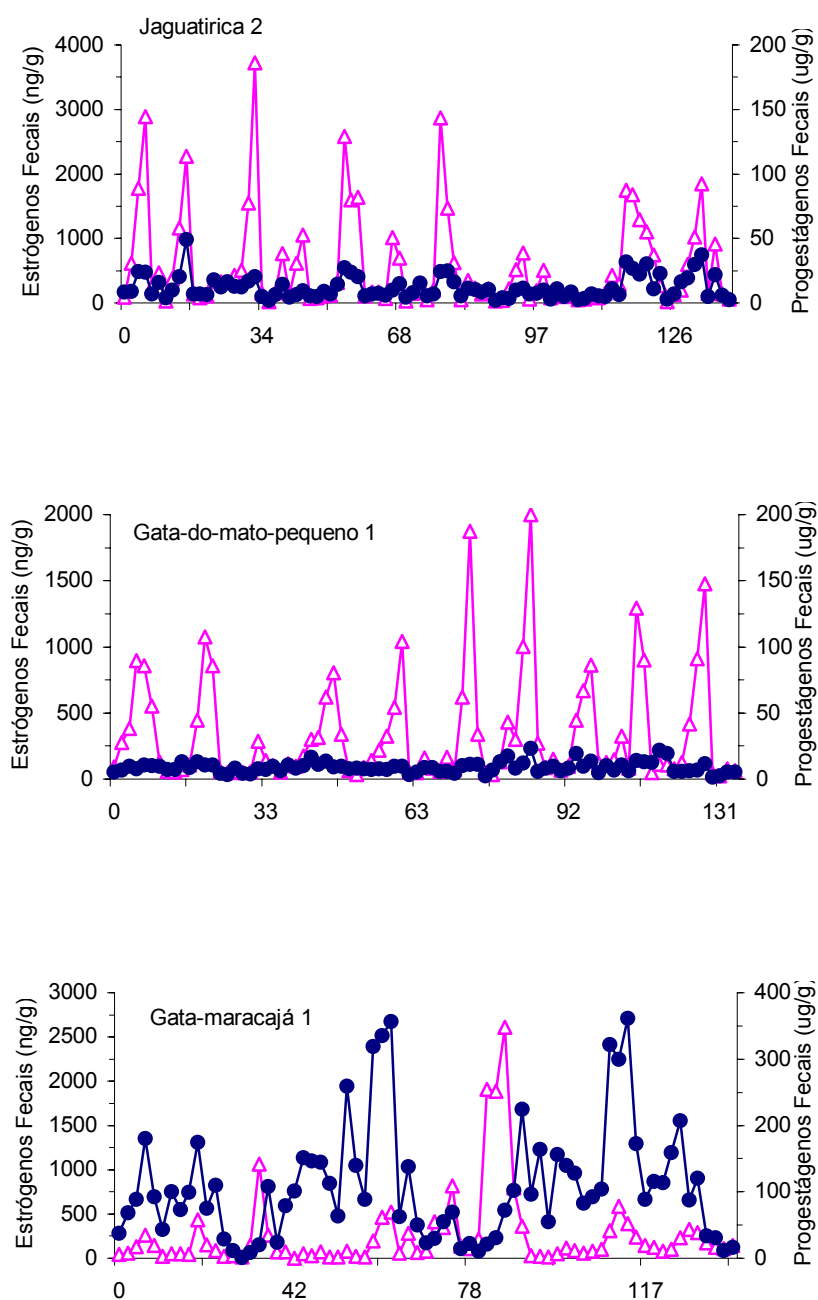


Fig. 9. Perfis de estrógeno fecal (triângulos vazios) e da excreção de metabólitos de progestágeno (círculos preenchidos) em fêmeas de jaguaririca, gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá durante um período de 4,5 meses, mostrando a ciclicidade ovariana (jaguaririca e gato-do-mato-pequeno) e ovulações espontâneas sucessivas (gato-maracajá) em maior detalhe.



TABELA 2. Número e tamanho (média \pm SEM) dos folículos ovarianos, CL e diâmetro uterino em fêmeas de jaguatirica, gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá durante os exames laparoscópicos conduzidos em setembro e abril

Animal (datas das laparoscopias)	Setembro			Abril		
	Estruturas		Diâmetro	Estruturas		Diâmetro
	ovarianas		uterino	ovarianas		uterino
	(diâmetro mm)		(mm)	(diâmetro mm)		(mm)
	Folículos	CL	Fase	Folículos	CL	Fase
Jaguaririca 1	4	0	8,0	4	0	8,0
(18/9 e 25/4)	(6,0 \pm 2,2)		estro	(6,2 \pm 0,6)		interestro
Jaguaririca 2	4	0	8,0	3	0	8,0
(18/9 e 25/4)	(4,2 \pm 0,5)		estro	(2,0 \pm 0,1)		anestro
Jaguaririca 3	1	0	8,0	0	0	6,0
(25/9 e 2/5)	(2,0)		interestro			anestro
Gata-do-mato-pequeno 1	1	0	2,5	0	0	4,0
(18/9 e 26/4)	(4,0)		estro			anestro
Gata-do-mato-pequeno 2	3	0	5,0	8	0	4,0
(19/9 e 26/4)	(2,3 \pm 0,3)		anestro	(1,4 \pm 0,2)		anestro
Gata-maracajá 1	3	0	12,0	6	2	16,0
(19/9 e 26/4)	(5,3 \pm 1,8)		estro	(5,5 \pm 0,9)	(2,0)	estro
Gata-maracajá 2	2	1	10,0	1	1	10,0
(25/9 e 30/4)	(7,0 \pm 1,0)	(6,0)	final do diestro	(5,0)	(4,0)	final do diestro



Com base nos perfis de estrógeno fecal, não houve evidência de atividade ovariana sazonal em jaguatiricas enquanto alterações cíclicas na excreção de estrógeno foram observadas durante cada mês do ano (Fig. 6). Padrões quantitativos e qualitativos de excreção cíclica de estrógeno diferiram entre as fêmeas de jaguatirica, com períodos acíclicos de vários meses de duração observados em duas das três fêmeas (Fig. 6). Na jaguatirica 1, picos significantes na excreção de estrógeno foram observados ao longo do ano, embora, na média, a magnitude dos picos tenha sido maior durante a primeira metade do estudo (500-1.300 ng/g; fevereiro a setembro) comparada com a segunda metade (<500 ng/g; outubro a maio). A jaguatirica 2 exibiu elevações cíclicas marcantes na excreção de estrógeno (altura do pico, 600-3.700 ng/g) mas apenas de agosto a fevereiro, com poucos picos observados durante os outros meses do estudo. A jaguatirica 3 ciclou de forma bem constante durante o estudo, com picos de estrógeno alcançando aproximadamente 750 ng/g, exceto nos últimos 3 meses (junho-agosto, isto é, outono-inverno) quando nenhuma ciclicidade foi evidente (Fig. 6).

Não foi possível detectar sazonalidade para as fêmeas de gato-do-mato-pequeno, porque apenas uma das duas fêmeas ciclou (gata-do-mato-pequeno 1) e não de forma constante. Períodos de anestro foram observados de outubro a dezembro e da metade de março até o final de abril (Fig. 7) no fim do estudo. A fêmea de gato-do-mato-pequeno 2 exibiu apenas duas ondas de estrógeno (a segunda com pequena magnitude), separadas por 18 dias em setembro.

Os perfis de esteróides fecais variaram entre as duas fêmeas de gato-maracajá (Fig. 8). Para a gata-maracajá 1, picos regulares de estrógeno ocorreram em intervalos de aproximadamente duas semanas, de fevereiro a julho, sem evidência de ovulação espontânea. Após isto, ao menos cinco fases luteais não induzidas por cópula foram observadas após as ondas de estrógeno. Essas fases luteais duraram 30 a 60 dias (média, $40,1 \pm 6,3$ dias) e alcançaram concentrações pico de progestágeno de 150 a 350 $\mu\text{g/g}$. As concentrações pico de estrógeno na gata-maracajá 2 ocorreram em intervalos de aproximadamente 35 dias de fevereiro a janeiro, após o que apenas duas ondas adicionais foram exibidas em março. Nessa fêmea, excreção aumentada de progestágeno foi observada após cada pico de estrógeno; entretanto, a magnitude (concentração pico de progestágeno, $25\text{--}50 \mu\text{g/g}$) e duração ($30,2 \pm 2,4$ dias) dessas presumidas fases luteais foram menores que aquelas observadas na gata-maracajá 1.



Análises estatísticas não foram realizadas devido ao baixo número de animais; entretanto, houve uma variação considerável nas concentrações fecais globais de estrógeno e progestágeno entre e dentro das espécies (Tabela 3). As concentrações elevadas de progestágenos fecais no gato-maracajá foram devidas principalmente à presença de CLs funcionais como resultado de ovulações espontâneas.

TABELA 3. Linha basal média (média \pm SEM) e concentrações pico de estrógenos fecais e metabólitos de progestágeno, por fêmea, para jaguatirica, gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá em amostras coletadas durante 14 a 18 meses

Fêmea	Estrógenos fecais		Progestágenos fecais	
	Linha basal (ng/g)	Pico (ng/g)	Linha basal (μg/g)	Pico (μg/g)
Jaguatirica 1	78,3 \pm 5,9	780,7 \pm 52,3	7,9 \pm 0,4	NA
Jaguatirica 2	68,4 \pm 4,7	1.781,6 \pm 65,3	8,7 \pm 0,6	NA
Jaguatirica 3	88,7 \pm 6,3	512,8 \pm 43,7	8,1 \pm 0,5	NA
Gata-do-mato-pequeno 1	97,1 \pm 3,1	1.090,2 \pm 136,2	7,2 \pm 0,3	NA
Gata-do-mato-pequeno 2	87,5 \pm 5,3	1.140,0 \pm 391,2	8,8 \pm 0,5	NA
Gata-maracajá 1	60,3 \pm 5,5	1.488,9 \pm 106,3	25,4 \pm 1,6	272,5 \pm 28,9
Gata-maracajá 2	78,1 \pm 9,5	1,773,4 \pm 397,9	6,4 \pm 0,8	31,6 \pm 2,9

NA, não aplicável.

Com base na citologia vaginal, na análise hormonal e nos achados laparoscópicos, o anestro ou o interestro (por presença de CL ou ausência de folículos) foram caracterizados por uma prevalência de células basais ou intermediárias, enquanto células com núcleo picnótico ou anucleadas foram mais prevalentes durante a fase folicular (ausência de CL e presença de folículos) (Tabela 4).



TABELA 4. Características individuais dos esfregaços vaginais colhidos de fêmeas de jaguatirica, gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá, durante os exames laparoscópicos realizados no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional em setembro e abril

Animal	Setembro				Abril			
	Citologia vaginal				Classificação morfológica das células epiteliais* (%)			
	Fase do ciclo estral				B	I	P	C
Jaguatirica 1	Muitos leucócitos. desfoliativas. Estro.	Células epiteliais			8	23	69	
Jaguatirica 2	Principalmente células anucleadas ou com núcleo picnótico. Ausência de leucócitos. Estro.				1	38	49	12
Gata-do-mato-pequeno 1	Muitos leucócitos. Principalmente células basais (pequenas e redondas). Presença de células epiteliais desfoliativas. Estro.				65	21	14	
Gata-do-mato-pequeno 2	Muitos leucócitos. Principalmente células basais. Algumas células epiteliais desfoliativas. Anestro.				74	16	6	4
Gata-maracajá 1	Presença de células naviculares; grande quantidade de leucócitos polimorfonucleares, células epiteliais desfoliativas com núcleos picnóticos, algumas células anucleadas. Estro.				23	77		

*B, basal; I, intermediária; P, núcleo picnótico; C, cornificada



A duração do estudo e as médias de excreção de estrógeno e progestágenos para cada fêmea podem ser visualizados na Tabela 5.

TABELA 5. Duração do estudo e médias de excreção de estrógeno e progestágenos (média \pm SEM) para cada fêmea

Animal	Duração do estudo (semanas)	Média total de estrógeno (ng/g)*	Média total de progestágenos (μg/g)*
Jagatirica 1	64	181,00 \pm 13,01	8,82 \pm 0,27
Jagatirica 2	64	340,03 \pm 29,94	11,90 \pm 0,46
Jagatirica 3	60	190,80 \pm 11,69	7,46 \pm 0,28
Gata-do-mato- pequeno 1	56	221,97 \pm 19,99	7,49 \pm 0,38
Gata-do-mato- pequeno 2	64	69,40 \pm 5,41	10,60 \pm 0,52
Gata-maracajá 1	64	358,21 \pm 31,68	66,60 \pm 4,37
Gata-maracajá 2	72	199,09 \pm 27,54	7,85 \pm 0,42

*Média \pm SEM (erro padrão da média)

NA, não aplicável



As concentrações médias de estrógenos fecais, por espécie, estão apresentadas na Figura 10.

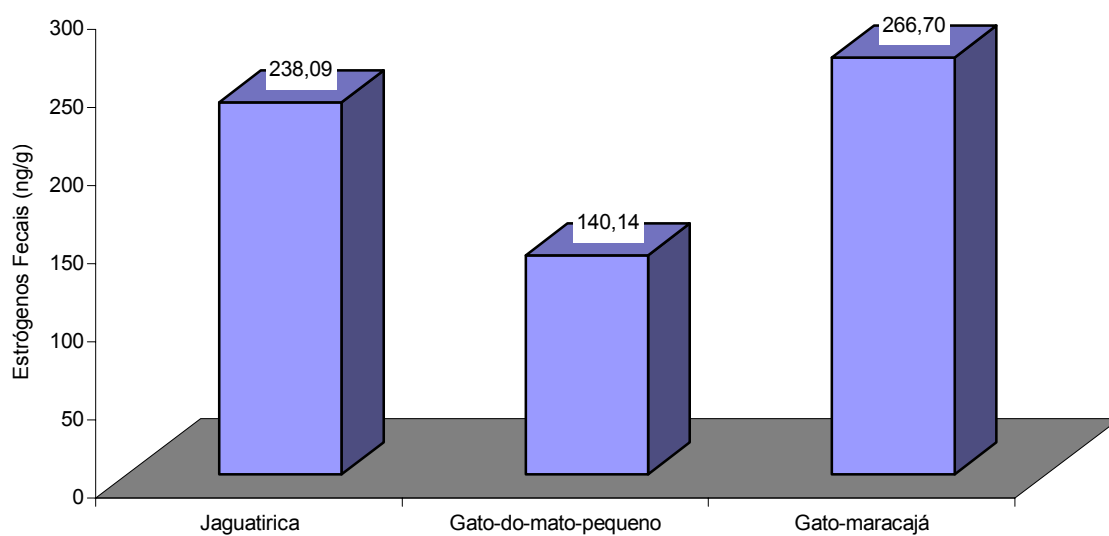


Fig. 10. Concentrações médias de estrógenos fecais em felídeos do gênero *Leopardus*.



Caso não considerarmos a fêmea de gato-do-mato-pequeno 2, que praticamente não apresentou elevações de estrógeno durante o período experimental, as concentrações médias de estrógeno fecal são apresentadas na Figura 11.

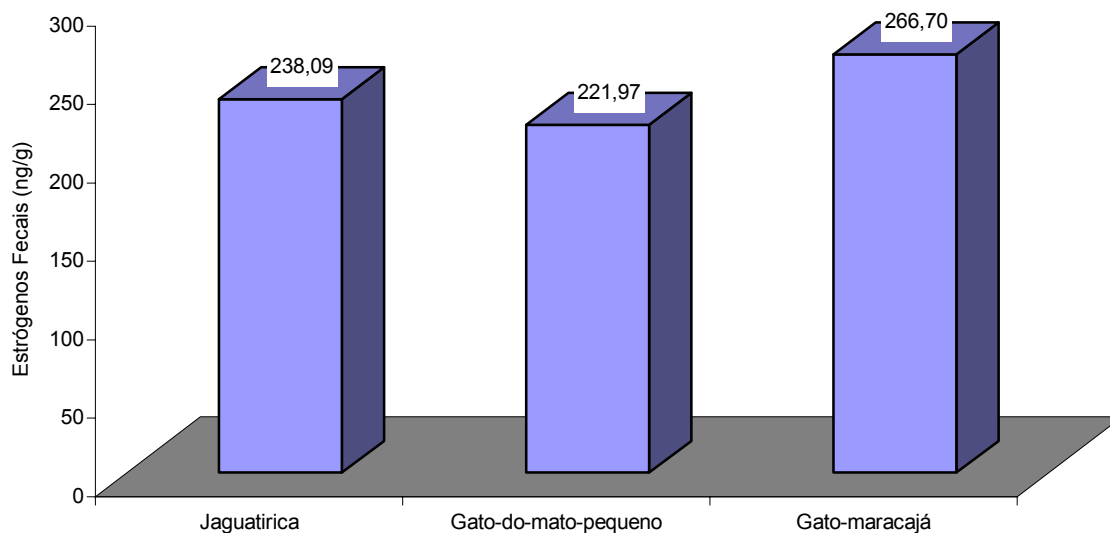


Fig. 11. Concentrações médias de estrógenos fecais em felídeos do gênero *Leopardus*, sem considerar a fêmea de gato-do-mato-pequeno 2.



As concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano para as jaguatiricas, estão apresentadas na Figura 12. A respectiva análise estatística está apresentada na Figura 13. As comparações entre as médias de concentração de estrógeno nas estações mostraram de forma geral, o outono como a estação com a menor concentração média, com diferença estatisticamente significativa quando comparado com as outras estações, utilizando-se o teste de Tukey-Kramer HSD ($q_{0,05} = 2,57$; $P < 0,05$). Isto não significa que essas fêmeas não tenham ciclado nesse período, apenas que tenderam a apresentar uma menor concentração de estrógeno, por maiores intervalos entre picos ou menores valores destes. Esse resultado coincide com o fato do outono apresentar um declínio gradual da temperatura, radiação e duração solar (Figs. 23 e 24).

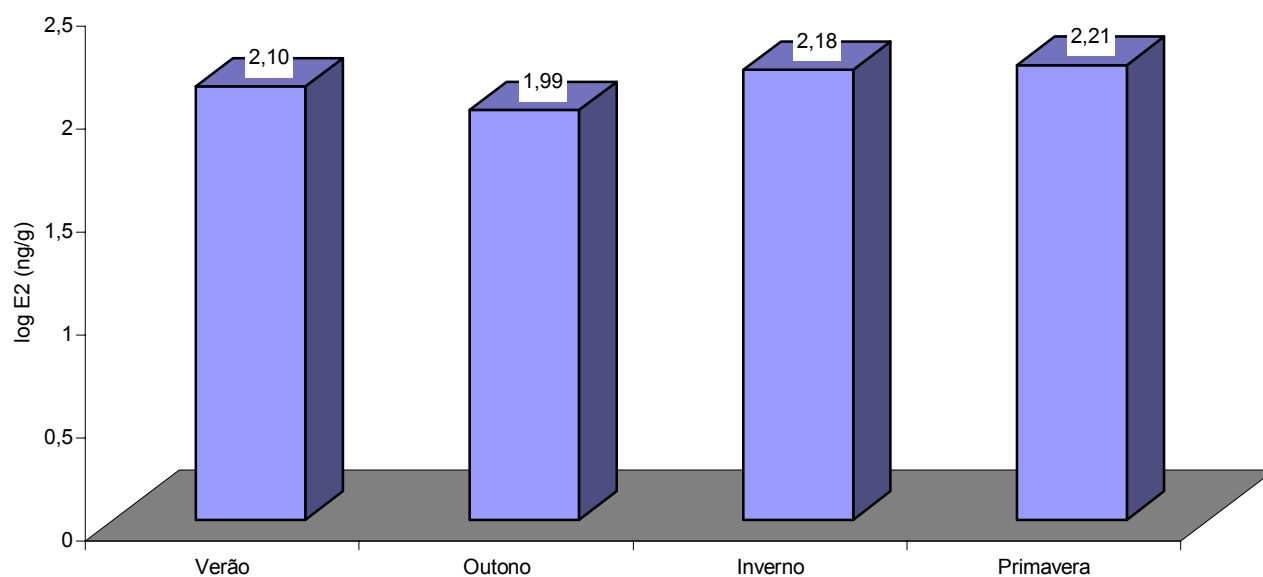


Fig. 12. Concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para as jaguatiricas.

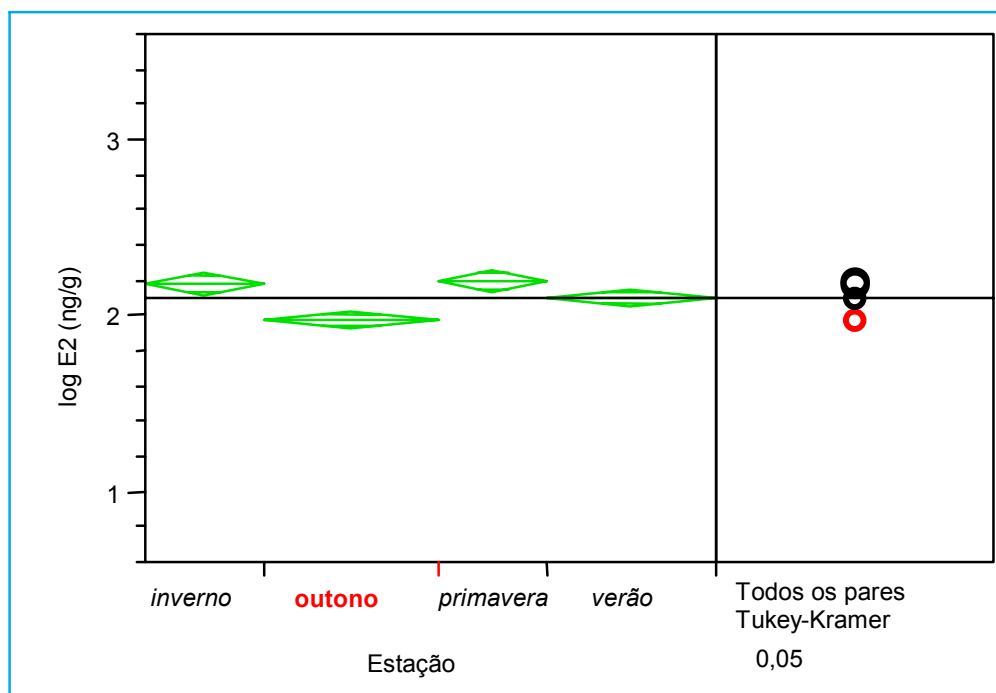


Fig. 13. Representação gráfica da análise estatística (teste de Tukey-Kramer HSD) das concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para as jaguatiricas. Em verde estão representados os losangos das médias. Os losangos das médias são uma representação esquemática da média e do erro padrão da média para cada grupo de amostras. A linha através de cada losango representa a média do grupo. A altura de cada losango representa o intervalo de confiança de 95% para cada grupo e a largura do losango representa o tamanho da amostra do grupo.



As concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para a fêmea jaguatirica 1, estão apresentadas na Figura 14. A respectiva análise estatística está apresentada na Figura 15. Analisando-se a influência das estações nos níveis de estrógeno, apenas o inverno apresentou diferença significativa em relação às outras estações ($q_{0,05} = 2,58$; $P < 0,05$). Sendo que, durante o inverno, essa fêmea de jaguatirica apresentou as maiores concentrações médias de estrógeno.

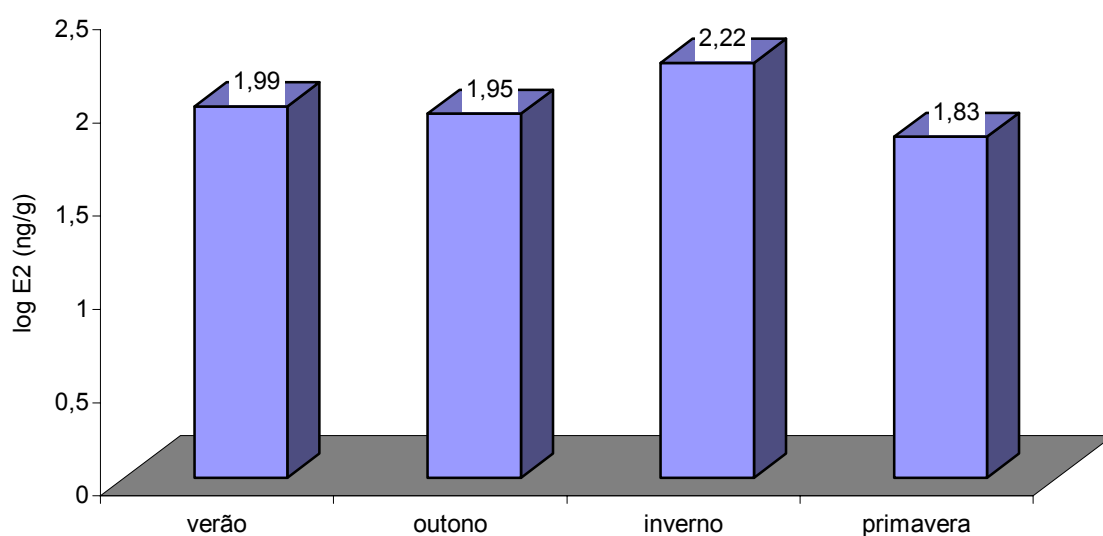


Fig. 14. Concentrações logarítmicas médias de estrógeno segundo a estação do ano, para a fêmea jaguatirica 1.

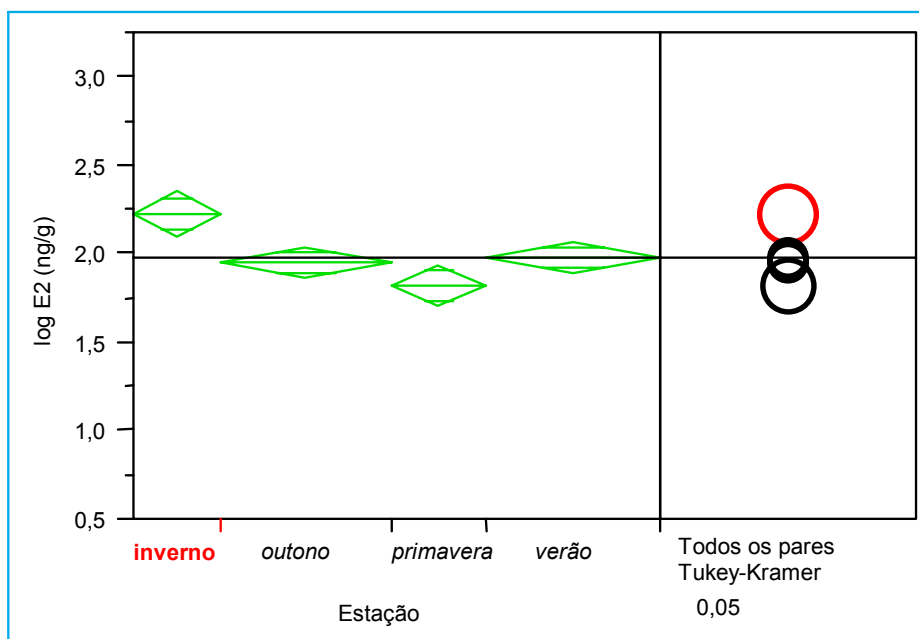


Fig. 15. Representação gráfica da análise estatística (teste de Tukey-Kramer HSD) das concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para a fêmea jaguatirica 1.



As concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para a fêmea jaguatirica 2, estão apresentadas na Figura 16. A respectiva análise estatística está apresentada na Figura 17. Analisando-se a influência das estações nos níveis de estrógeno, apenas o outono apresentou diferença significativa em relação às outras estações. Sendo que, durante o outono, essa fêmea de jaguatirica apresentou as menores concentrações médias de estrógeno ($q_{0,05} = 2,58$; $P < 0,05$).

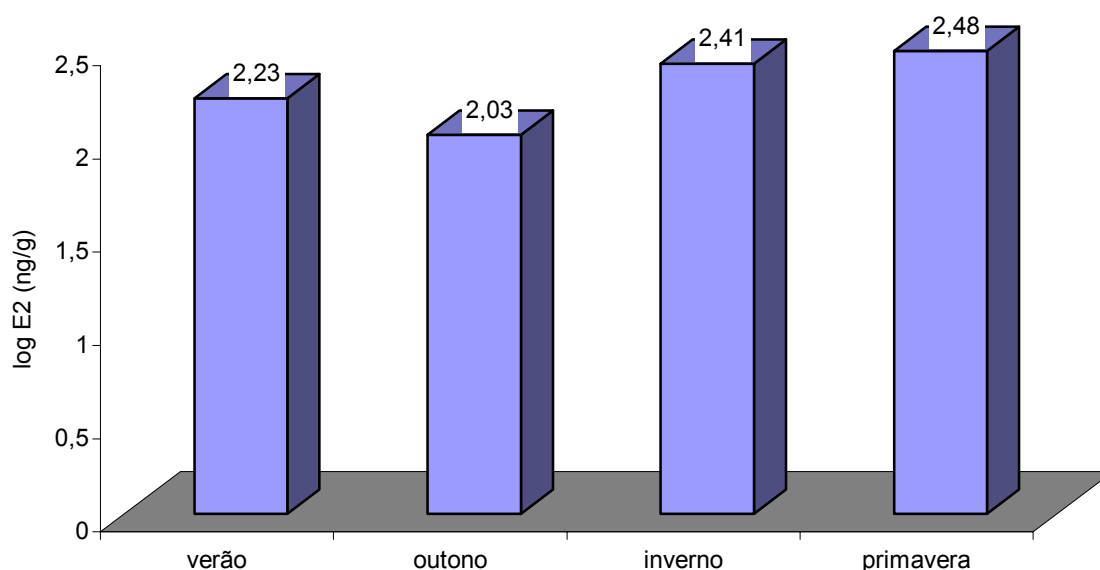


Fig. 16. Concentrações logarítmicas médias de estrógeno segundo a estação do ano, para a fêmea jaguatirica 2.

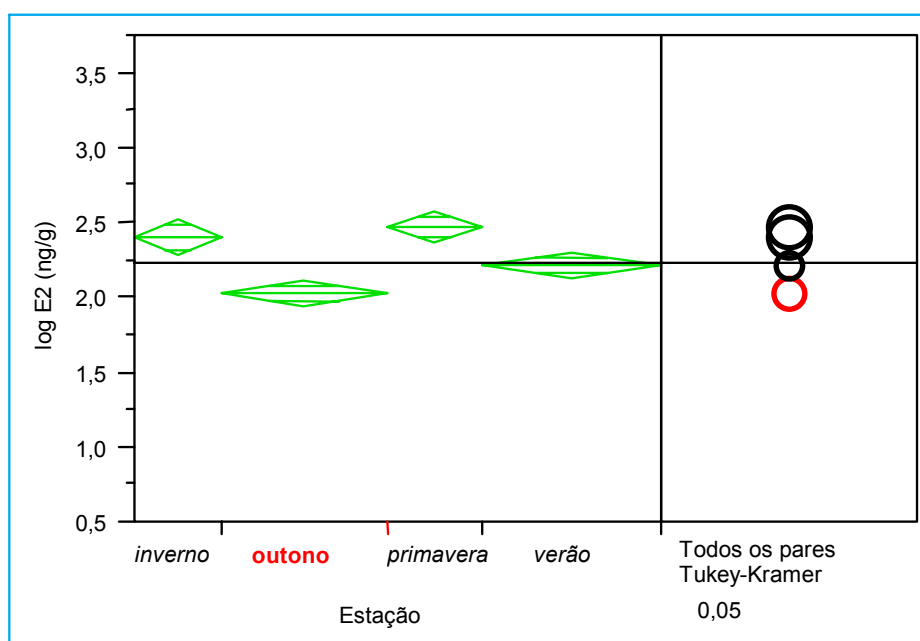


Fig. 17. Representação gráfica da análise estatística (teste de Tukey-Kramer HSD) das concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para a fêmea jaguatirica 2.



As concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para a fêmea jaguatirica 3, estão apresentadas na Figura 18. A respectiva análise estatística está apresentada na Figura 19. Analisando-se a influência das estações nos níveis de estrógeno, apenas a primavera apresentou diferença significativa em relação às outras estações. Sendo que, durante a primavera, essa fêmea de jaguatirica apresentou as maiores concentrações médias de estrógeno ($q_{0,05} = 2,58$; $P < 0,05$).

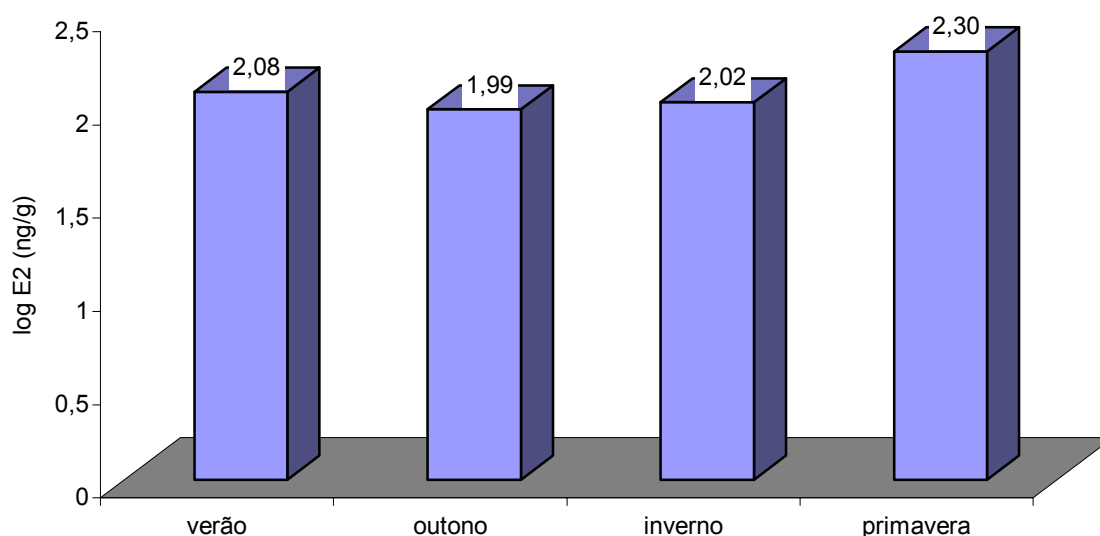


Fig. 18. Concentrações logarítmicas médias de estrógeno segundo a estação do ano, para a fêmea jaguatirica 3.

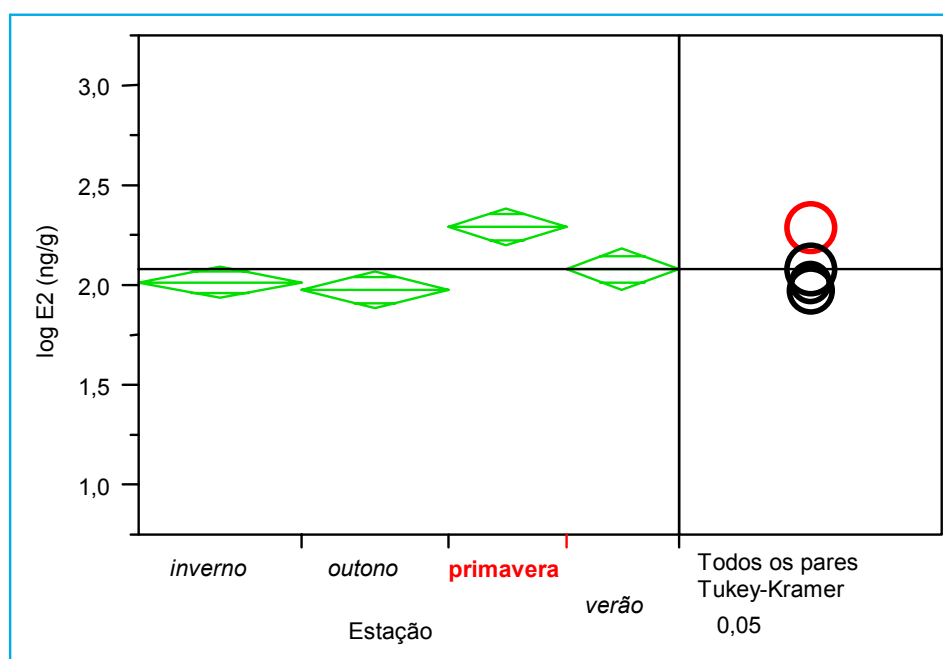


Fig. 19. Representação gráfica da análise estatística (teste de Tukey-Kramer HSD) das concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para a fêmea jaguatirica 3.

As concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para as gatas-do-mato-pequeno, não estão apresentadas porque apenas uma das duas fêmeas ciclou (gata-do-mato-pequeno 1). Analisando-se a influência das estações nos níveis de estrógeno, apenas o inverno apresentou diferença significativa em relação às outras estações. Sendo que, durante o inverno, essa fêmea de gato-do-mato-pequeno apresentou as maiores concentrações médias de estrógeno ($q_{0,05} = 2,58$; $P < 0,05$).



As concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para as gatas-maracajá, estão apresentadas na Figura 20. A respectiva análise estatística está apresentada na Figura 21. Foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas médias de concentração de estrógeno entre as estações, apenas quando comparou-se inverno e verão ($q_{0,05} = 2,58$; $P < 0,05$).

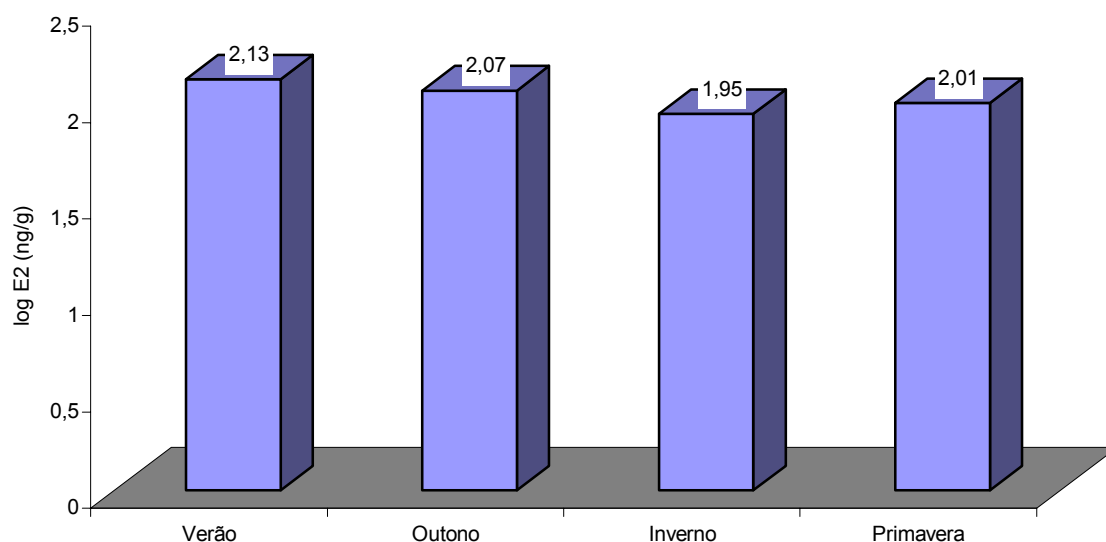


Fig. 20. Concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para as gatas-maracajá.

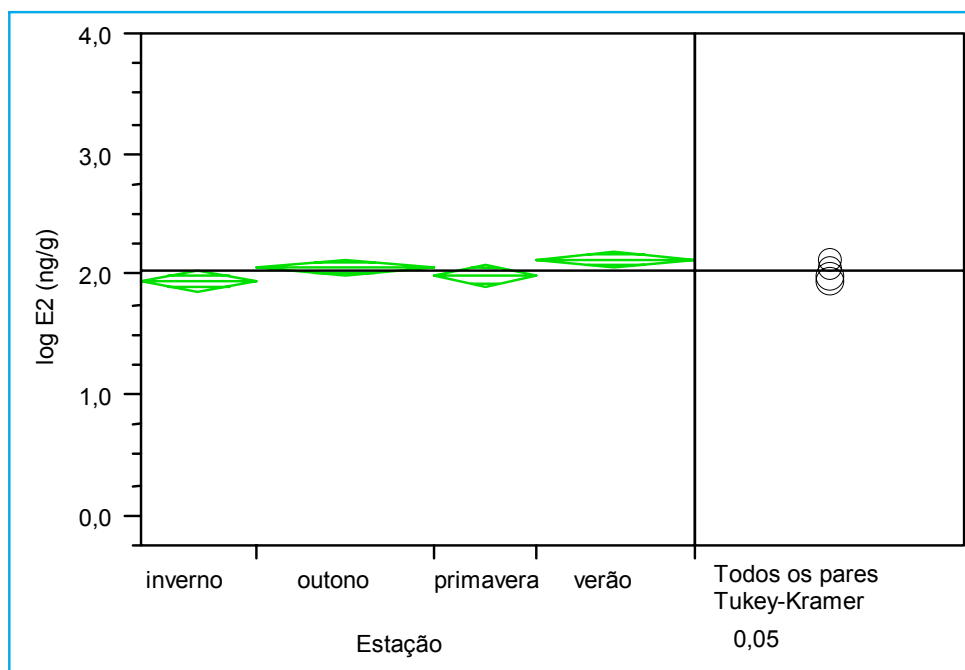


Fig. 21. Representação gráfica da análise estatística (teste de Tukey-Kramer HSD) das concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para as gatas-maracajá.



As concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para a gata-maracajá 1, estão apresentadas na Figura 22. A respectiva análise estatística está apresentada na Figura 23. Analisando-se a influência das estações nos níveis de estrógeno, apenas o inverno apresentou diferença significativa em relação ao outono e ao verão. Sendo que, durante o inverno, essa fêmea de gato-maracajá apresentou as menores concentrações médias de estrógeno ($q_{0,05} = 2,58$; $P < 0,05$).

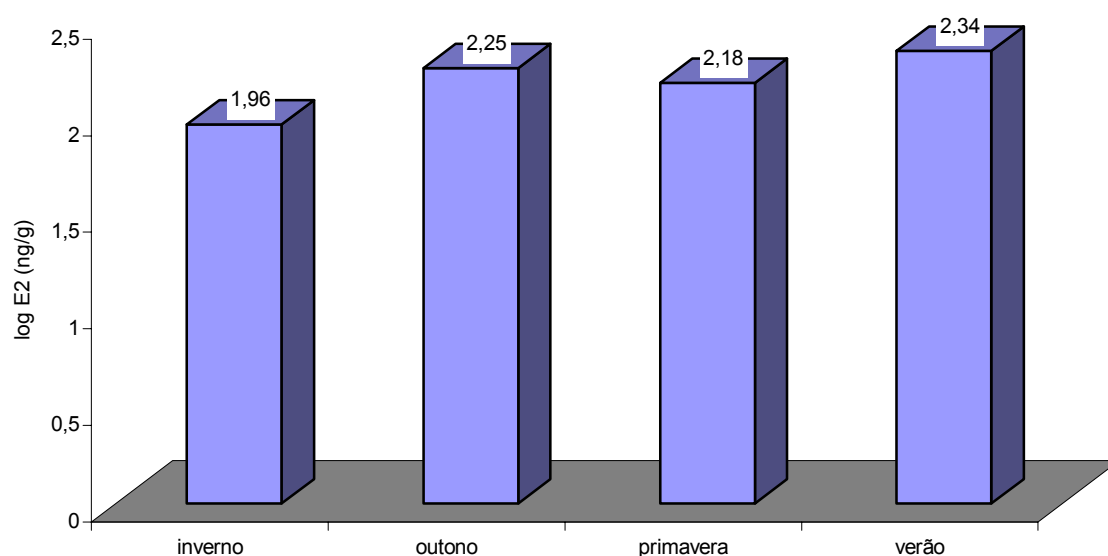


Fig. 22. Concentrações logarítmicas médias de estrógeno segundo a estação do ano, para a gata-maracajá 1.

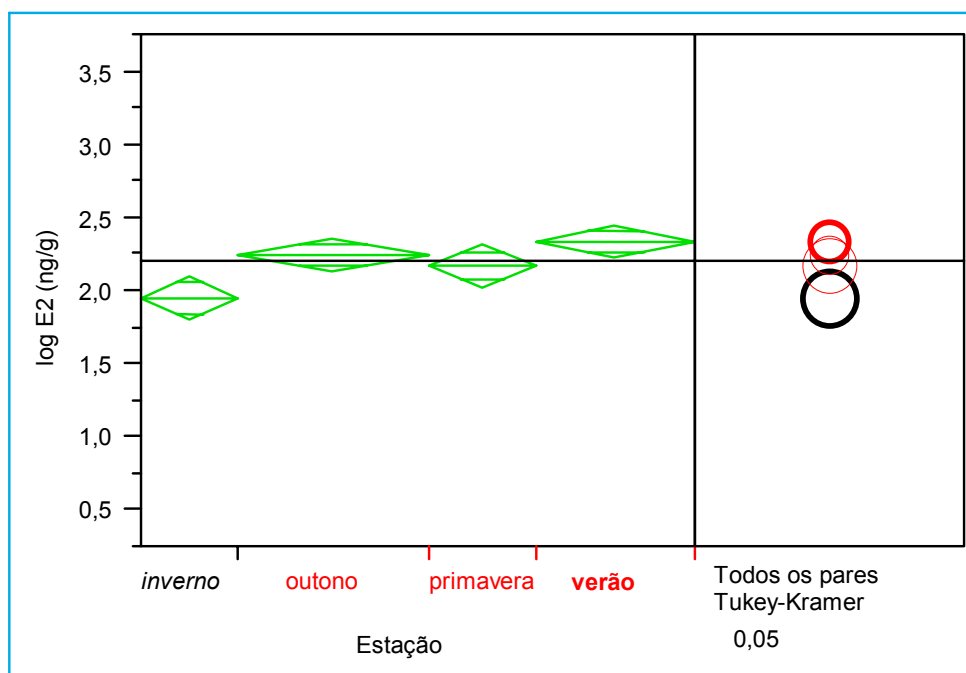


Fig. 23. Representação gráfica da análise estatística (teste de Tukey-Kramer HSD) das concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para a gata-maracajá 1.



As concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para a gata-maracajá 2, estão apresentadas na Figura 24. A respectiva análise estatística está apresentada na Figura 25. Analisando-se a influência das estações nos níveis de estrógeno, não houve diferença significativa entre estações ($q_{0,05} = 2,58$; $P < 0,05$).

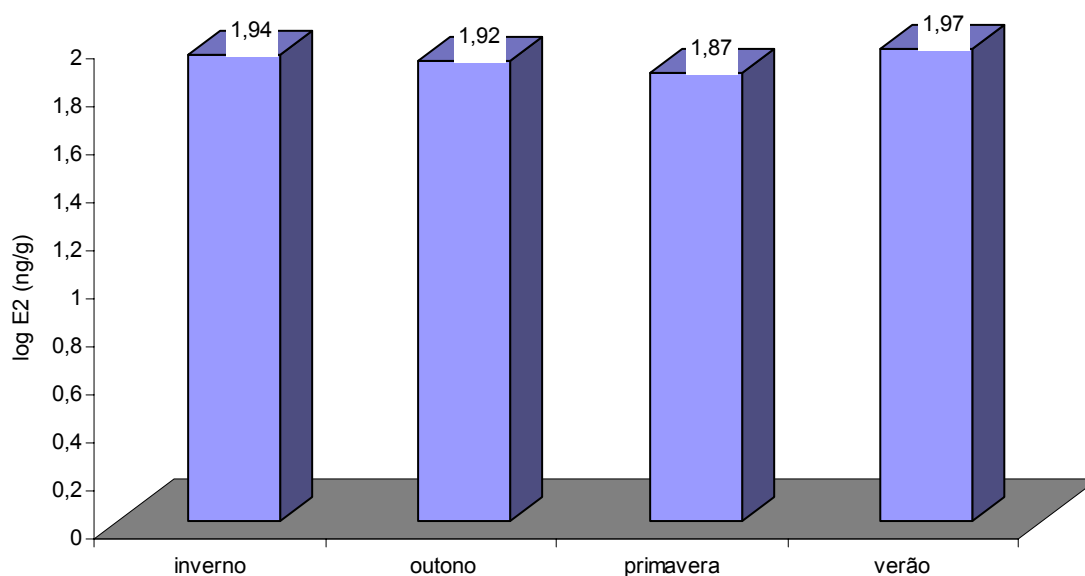


Fig. 24. Concentrações logarítmicas médias de estrógeno segundo a estação do ano, para a gata-maracajá 2.

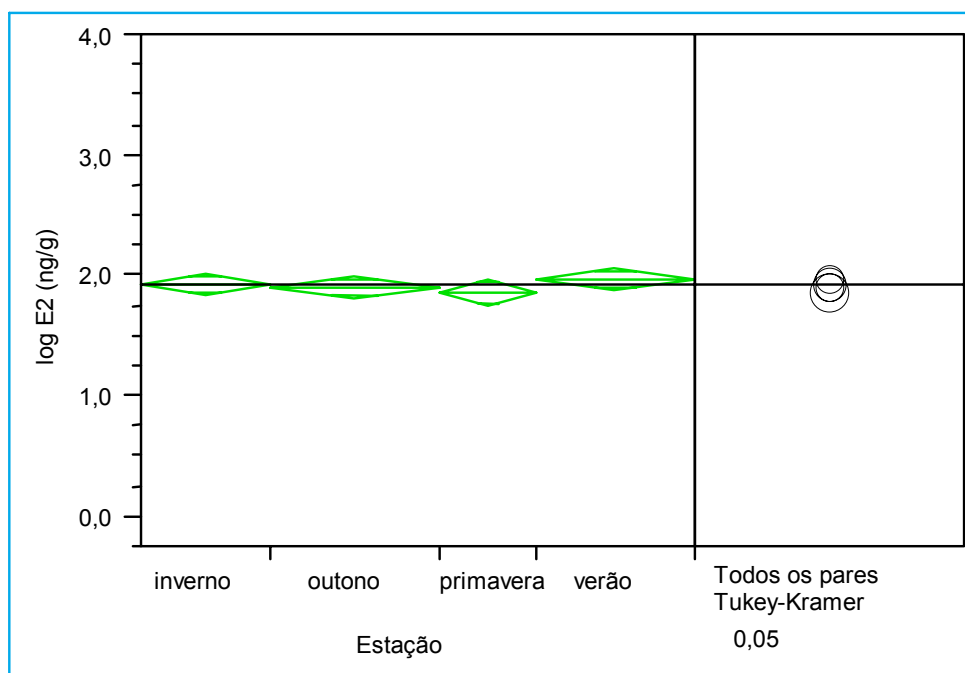


Fig. 25. Representação gráfica da análise estatística (teste de Tukey-Kramer HSD) das concentrações logarítmicas médias de estrógeno, segundo a estação do ano, para a gata-maracajá 2.



A análise dos dados meteorológicos dos anos em que foi realizado o experimento apresentou os resultados que podem ser visualizados nas Figuras 26 e 27.

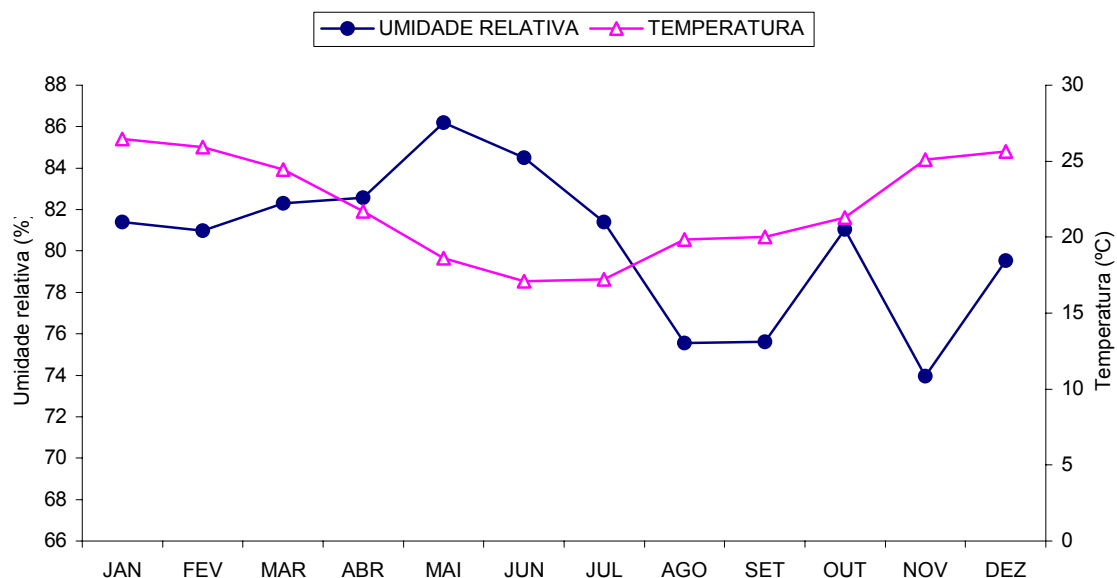


Fig. 26. Variação mensal média de umidade relativa (círculos preenchidos) e temperatura (triângulos vazios) do ar durante os anos do experimento (Fonte: Estação Meteorológica da Itaipu Binacional).

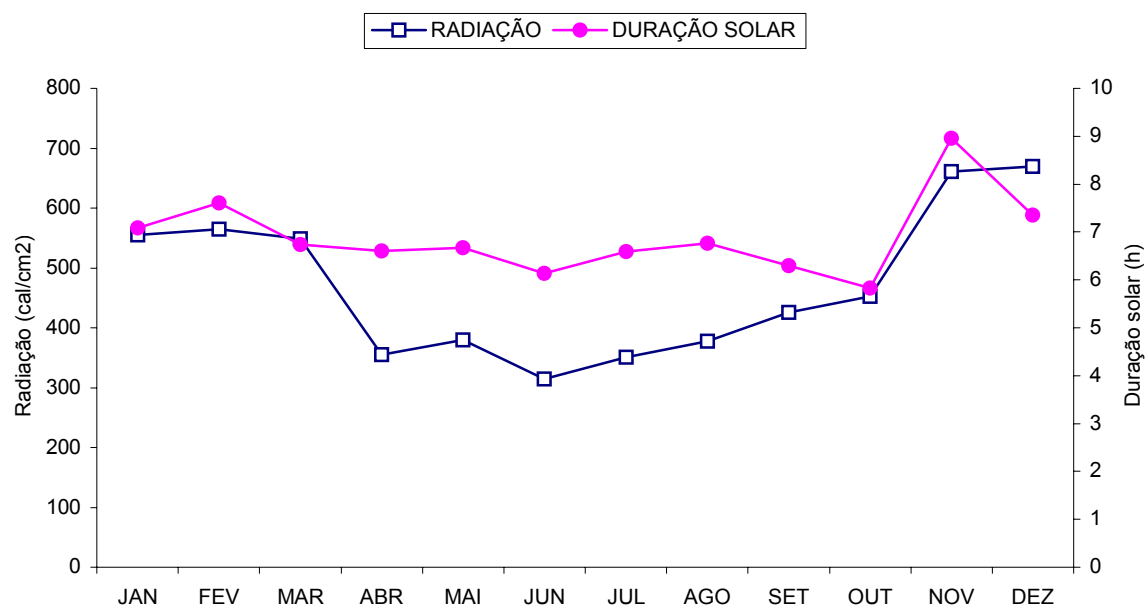


Fig. 27. Variação mensal média de radiação (quadrados vazios) e duração solar (círculos preenchidos) durante os anos do experimento (Fonte: Estação Meteorológica da Itaipu Binacional).



As correlações entre os dados meteorológicos e as concentrações de estrógeno e progestágenos para cada fêmea são apresentadas nas Tabelas 6 e 7. Através da análise dos coeficientes de correlação do estrógeno e dos progestágenos com os parâmetros meteorológicos (umidade, radiação, duração solar e temperatura) verificamos que a correlação da atividade ovariana com os parâmetros ambientais foi sempre muito baixa, seja ela negativa ou positiva. Portanto, os parâmetros ambientais parecem não interferir ou interferir pouco na produção de estrógenos. De forma geral, quando existe correlação significativa (com $P < 0,05$ ou $0,01$), a radiação, a temperatura e a duração solar parecem influenciar positivamente a produção de estrógenos; ao passo que a umidade relativa do ar parece influenciar negativamente.

TABELA 6. Valores dos coeficientes de correlação entre as concentrações de estrógeno e os dados meteorológicos para cada fêmea utilizada no experimento

Fêmea	Umidade relativa	Radiação	Duração solar	Temperatura
Gata-do-mato-pequeno 1	-0,0919	-0,1085	0,0471	-0,0534
Gata-do-mato-pequeno 2	-0,0794	-0,1237*	-0,0200	-0,0478
Jaguaririca 1	0,0132	-0,1978**	-0,1152*	-0,0806
Jaguaririca 2	-0,2475**	0,0502	0,0177	0,1338*
Jaguaririca 3	-0,2008**	0,0799	0,1191*	0,2519**
Gata-maracajá 1	0,0314	0,0942	0,0682	0,0579
Gata-maracajá 2	-0,1028	0,1026*	0,0891	0,0455
Média	-0,0968	-0,0147	0,0294	0,0439

* $P < 0,05$

** $P < 0,01$



TABELA 7. Valores dos coeficientes de correlação entre as concentrações de progestágenos e os dados meteorológicos para cada fêmea utilizada no experimento

Fêmea	Umidade relativa	Radiação	Duração solar	Temperatura
Gata-do-mato-pequeno 1	-0,0442	-0,0912	0,0169	-0,1906**
Gata-do-mato-pequeno 2	-0,1377*	0,0224	0,0089	0,0047
Jaguaririca 1	0,0921	0,1138*	-0,0163	-0,0068
Jaguaririca 2	0,0666	-0,1636**	-0,1277*	-0,1168*
Jaguaririca 3	0,0179	0,0218	0,0034	-0,0441
Gata-maracajá 1	-0,2323**	0,2355**	0,1860**	0,2505**
Gata-maracajá 2	-0,0921*	-0,0562	0,0001	0,0060
Média	-0,0471	0,0118	0,0102	-0,0139

* $P < 0,05$

** $P < 0,01$

A gata-maracajá 1 (alojada na Itaipu) apresentou correlações significantes ($P < 0,01$) entre as concentrações de progestágenos e os parâmetros ambientais. Portanto os parâmetros radiação, duração solar e temperatura parecem influenciar positivamente a taxa de ovulação, ao passo que a umidade relativa apresentou correlação negativa significativa ($P < 0,01$). Esta fêmea também apresentou maiores concentrações de progestágenos na primavera, diferindo estatisticamente das outras estações ($q_{0,05} = 2,58$; $P < 0,05$), o que parece corroborar a hipótese anterior.

As concentrações logarítmicas médias de progestágenos, por espécie, estão apresentadas na Figura 28. A respectiva análise estatística está apresentada na Figura 29. A análise das médias de concentração de progestágenos mostrou que apenas o gato-maracajá apresentou diferença significativa em relação às outras espécies ($q_{0,05} = 2,34$; $P < 0,05$).

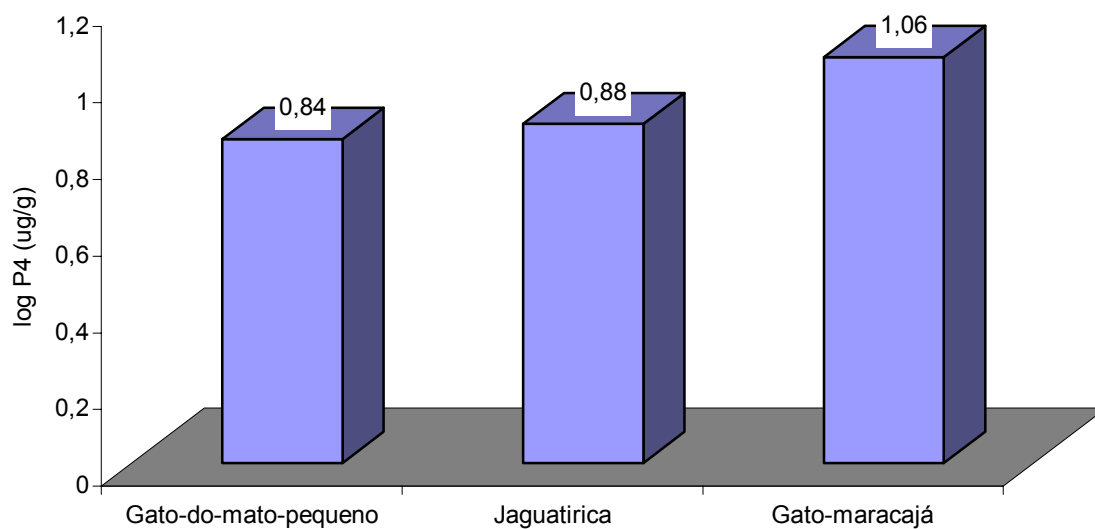


Fig. 28. Concentrações logarítmicas médias de progestágenos em felídeos do gênero *Leopardus*.

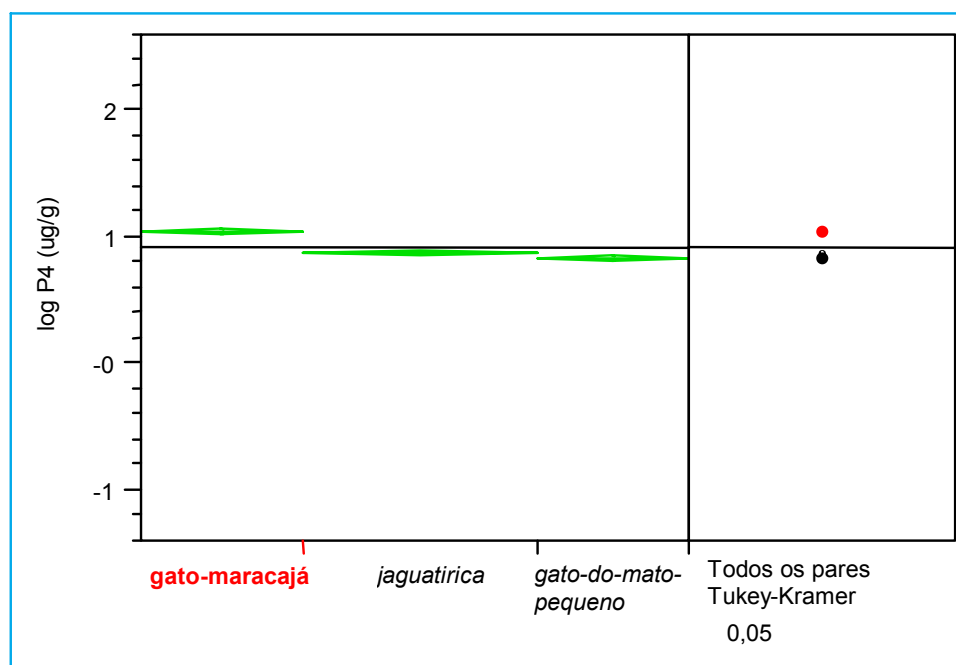


Fig. 29. Representação gráfica da análise estatística (teste de Tukey-Kramer HSD) das concentrações logarítmicas médias de progestágenos, por espécie.



As fêmeas de gato-do-mato-pequeno apresentaram maiores concentrações de progestágenos no inverno ($q_{0,05} = 2,58$; $P < 0,05$), talvez refletindo a luteinização de maior número de folículos que entraram em atresia nesse período, pois durante o inverno também foram encontradas maiores concentrações de estrógenos para essa espécie ou a significativa correlação entre estrógenos e progestágenos (observada para ambas as fêmeas de gato-do-mato-pequeno; $r_1 = 0,3865$ e $r_2 = 0,4351$; $P < 0,01$). Esse quadro também repetiu-se quando foram analisadas as concentrações de estrógenos e progestágenos ao longo das estações apenas para a fêmea de gato-do-mato-pequeno 1 ($q_{0,05} = 2,58$; $P < 0,05$). A fêmea de gato-do-mato-pequeno 2 apresentou apenas um pico de estrógeno em 4/set, seguido de um segundo pico bem menor em 18/set; suas concentrações de progestágenos não apresentaram diferença significativa ($q_{0,05} = 2,58$; $P < 0,05$) ao longo das estações.

As fêmeas de jaguatirica, como era de se esperar, pela ausência de ovulações espontâneas, não apresentaram variação significativa de progestágenos ao longo das estações ($q_{0,05} = 2,57$; $P < 0,05$), apesar da significativa correlação entre estrógenos e progestágenos ($P < 0,01$).

As fêmeas de gato-maracajá apresentaram maior concentração média de progestágenos durante a primavera, com diferença significativa quando comparada com o outono e o verão ($q_{0,05} = 2,58$; $P < 0,05$), vale lembrar que suas concentrações de estrógenos tiveram variação significativa ($q_{0,05} = 2,58$; $P < 0,05$) apenas quando comparou-se o verão (com maiores concentrações) com o inverno (menores).



DISCUSSÃO

Os ensaios de esteróides fecais têm sido validados para um número de espécies de felídeos silvestres, incluindo o tigre (*Panthera tigris*), chita ou guepardo (*Acinonyx jubatus*), leopardo-nebuloso (*Neofelis nebulosa*), leopardo-das-neves (*Panthera uncia*), leão (*Panthera leo*), leopardo (*Panthera pardus*), gato-leopardo (*Prionailurus bengalensis*), "black-footed cat" (*Felis nigripes*), gato-pescador ("fishing cat", *Prionailurus viverrinus*), serval (*Leptailurus serval*), caracal (*Caracal caracal*), lince (*Lynx rufus*) e "Palla's cat" (*Otocolobus manul*) [Shille et al., 1991; Brown et al., 1994, 1995, 1996; Czekala et al., 1994; Graham et al., 1995]. Em geral, as fêmeas dessas espécies ciclam com intervalos de duas a quatro semanas, com o estro durando de 3 a 10 dias.

O estudo agora apresentado adiciona a jaguatirica, gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá à base existente de dados endócrinos. De forma geral, essas fêmeas ciclaram dentro da variação previamente relatada para outras espécies de felídeos. Entretanto, os resultados sugerem que podem ocorrer diferenças específicas nas concentrações globais de metabólitos fecais de esteróides, particularmente estrógenos. No Laboratório de Endocrinologia do *Conservation & Research Center - Smithsonian Institution*, as concentrações pico de estrógeno fecal em gato-do-mato-pequeno, jaguatirica, gato-maracajá [esse estudo], "Pallas' cat" [J.L. Brown & W.F. Swanson, não publicado] e gato-pescador ("fishing cat") [R. Moreland, J.G. Howard & J.L. Brown, não publicado] são mais altas em média (linha basal, >60 ng/g; picos, >800 ng/g) que aquelas observadas em chita, leopardo nebuloso e para a maioria das espécies do gênero *Panthera* (linha basal, <50 ng/g; picos, <500 ng/g) [Brown et al., 1994; 1995; 1996]. Esses dados sugerem uma tendência para concentrações mais altas de metabólitos de estrógeno nas fezes das espécies de pequenos felídeos. Entretanto, não se sabe se essas diferenças de concentração ocorrem devido a variações espécie-específicas na produção de esteróide, taxa de excreção ou metabolismo. Embora a análise por cromatografia líquida de alta performance da imunoatividade de estrógeno fecal em outras espécies de felídeos (gato doméstico, chita, leopardo-nebuloso, gato-leopardo, leopardo-das-neves) sugeriu que o metabolismo de esteróides é razoavelmente conservado dentro do táxon [Brown et al., 1994], não podemos descartar a possibilidade de que haja diferenças espécie-específicas nas formas ou quantidades de metabólitos com reação



cruzada. Por exemplo, fezes de leopardo-nebuloso contêm uma proporção mais alta de um aparente metabólito de estrógeno conjugado comparadas com outras espécies examinadas.

Os cálculos para determinação dos níveis basais de estrógeno foram realizados para cada indivíduo, considerando-se que cada animal apresenta um determinado limiar. Como exemplo, podemos citar que fêmeas de uma mesma espécie podem começar a apresentar sinais comportamentais de estro sob diferentes níveis de estrógeno. Podemos considerar também que uma mesma fêmea pode apresentar diferentes limiares para ativação dos sinais comportamentais, dependendo, por exemplo, do ambiente a que está sendo submetida e de sua idade.

As concentrações pico de estrógenos variaram consideravelmente dentro e entre indivíduos. Essas variações também têm sido descritas para outros mamíferos, como o tamanduá-bandeira [Patzl et al., 1998]. Nesse trabalho os autores descrevem que em um animal a concentração pico durante a fase folicular em que ocorreu o acasalamento foi a menor de todos os animais estudados, porém as concentrações de estrógenos durante a segunda e terceira fases foliculares pós-parto foram das mais altas. Isso corrobora a possibilidade de ocorrer o mesmo em fêmeas de pequeno felídeos.

Resultados das análises de esteróides fecais combinados com observações laparoscópicas diretas dos ovários indicaram que nem jaguatiricas nem gatas-do-mato-pequeno ovularam espontaneamente durante o estudo. Ao contrário, CL não induzido por coito e aumento da atividade progestágena foram freqüentemente observados em ambas as fêmeas de gato-maracajá. O intervalo entre estros com maior variação foi devido à presença dessas fases luteais não gestacionais. Esses dados adicionam à crescente evidência de que as respostas ovulatórias de felídeos são altamente variáveis. Até o momento, ovulações espontâneas têm sido consideradas como raras ou não existentes no chita [Brown et al., 1996], tigre [Seal et al., 1985], puma [Bonney et al., 1981] e leopardo-das-neves [Schmidt et al., 1993], ao passo que uma proporção relativamente alta de ovulações espontâneas tem sido observada no leão [Schramm et al., 1994], leopardo-nebuloso [Brown et al., 1995] e agora no gato-maracajá. No gato-maracajá isso pode estar relacionado com o fato dos machos não possuírem espículas no pênis. Mesmo o gato doméstico, longamente conhecido como um ovulador reflexo clássico [Shille et al., 1979; Wildt et al., 1981], pode ovular espontaneamente, algumas vezes freqüentemente, dependendo do indivíduo, das condições de alojamento e possivelmente da genética [Concannon, 1991; Lawler et al., 1993; Gudermuth et



al., 1997; Graham, 2000]. As fêmeas de gato-maracajá analisadas apresentaram atividade ovariana durante o ano todo e ovulações espontâneas especialmente de setembro a abril, quando há uma elevação no fotoperíodo, radiação solar e temperatura na Região Sul do Brasil (Figs. 26 e 27). A gata-maracajá 1, que apresentou maiores concentrações de progestágenos durante as ovulações não induzidas por coito, também apresentou correlações significativas ($r = 0,186-0,250$; $P < 0,01$) da produção de progestágenos com estes parâmetros ambientais (Tabela 7). Assim, os mecanismos ovulatórios variam dentro da família Felidae, talvez regulados em maior ou menor grau pela espécie e mesmo respostas individuais específicas a estímulos ainda não identificados.

Com relação aos resultados da citologia vaginal, associados à análise hormonal e aos achados laparoscópicos, o anestro e o interestro (por presença de CL ou ausência de folículos) foram caracterizados por uma prevalência de células basais ou intermediárias, enquanto células com núcleo picnótico ou anucleadas foram mais prevalentes durante a fase folicular (ausência de CL e presença de folículos). Estes resultados foram similares aos obtidos por Tebet (1999) em exames citológicos vaginais de jaguatiricas. As células vaginais encontradas nas três espécies foram similares aos tipos celulares descritos para gatas domésticas e ratas. Foram observadas células basais, intermediárias, superficiais com núcleo picnótico e superficiais cornificadas anucleadas.

Com base na análise de estrógeno fecal, sazonalidade ovariana nesses animais não foi aparente. Os registros de nascimento em cativeiro para essas espécies, no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional, entre 1992 e 2000 (22 nascimentos), indicaram que nascimentos ocorreram em todos os meses do ano, exceto junho (Wanderlei de Moraes & Marcos José de Oliveira, comunicação pessoal). Devido aos locais de pesquisa estarem localizados na extensão sul da área de ocorrência natural para cada espécie, as flutuações do fotoperíodo provavelmente foram comparáveis com as máximas flutuações sazonais observadas pelas populações em vida livre. Em regiões mais próximas da Linha do Equador talvez essas diferenças não sejam tão sensíveis. O fotoperíodo é, no mínimo, parcialmente responsável pela modulação da atividade ovariana em alguns felídeos silvestres, como o tigre [Seal et al., 1985], leopardo-nebuloso [Brown et al., 1995], "*Palla's cat*" [J.L. Brown & W.F. Swanson, não publicado] e leopardo-das-neves [Schmidt et al., 1993]. De forma diferente, leões em cativeiro [Schmidt et al., 1979], leopardos [Schmidt et al., 1988], chitas [Brown et al., 1996] e pumas (*Puma concolor*) [Boney et al., 1981] parecem não exibir



flutuações sazonais na atividade ovariana. Está claro que existe uma ampla variação nos padrões reprodutivos sazonais entre espécies de felídeos. Essa informação é importante para a coordenação de atividades reprodutivas, visto que introduções para acasalamento em período impróprio podem levar à apatia reprodutiva ou agressão.

Esses resultados coincidem com a literatura que cita que provavelmente não há estação reprodutiva para a jaguatirica, apesar que, para animais em vida livre, picos de reprodução tenham sido observados no outono no Texas (Tewes 1986) e no México (Leopold 1959); e picos de outubro a janeiro tenham sido relatados para o Paraguai (Rengger 1830) e nordeste da Argentina (Crespo 1982).

A aparente falta de uma distinta sazonalidade reprodutiva nesses felídeos sul-americanos sugere que acasalamentos podem ser tentados durante o ano todo. Entretanto, embora a ciclicidade estral tenha sido observada em cada mês do ano, períodos variáveis de inatividade folicular foram observados na maioria dos indivíduos. Não houve explicação óbvia para esses períodos acíclicos; eles não foram síncronos entre fêmeas na mesma instituição e nem relacionados a qualquer prática de manejo evidente ou alteração ambiental. Devido a essas fêmeas terem sido alojadas individualmente, esses episódios provavelmente não foram devidos à supressão reprodutiva como tem sido encontrada para chitas em cativeiro, alojadas em grupo [Brown et al., 1996, no prelo], mas podem ser indicativos de outras condições inapropriadas sociais ou de manejo que inibem a reprodução normal.

Compreender a(s) causa(s) desses períodos de inatividade ovariana é importante para determinar porque essas espécies reproduzem tão pouco em cativeiro, apesar dos intensivos esforços reprodutivos pelos zoológicos brasileiros e por outras instituições espalhadas pelo mundo. Uma vez que as causas de baixo desempenho reprodutivo sejam compreendidas, o próximo objetivo será identificar soluções mitigadoras; e a monitorização esteróide fecal será chave para avaliar seus efeitos na função ovariana.



CONCLUSÕES

1. As análises de estrógeno fecal indicaram que fêmeas de jaguatirica, gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá, em condições de cativeiro na Região Sul do Brasil, foram poliétricas e não exibiram evidência de reprodução sazonal; portanto, tentativas de reprodução podem ser conduzidas durante o ano todo.
2. Ovulações espontâneas não foram observadas em fêmeas de jaguatirica e gato-do-mato-pequeno, sugerindo que, caso ocorram, são raras nessas espécies.
3. Ao contrário, as observações regulares de atividade luteal não induzida por cópula em fêmeas de gato-maracajá sugerem que essa resposta ovulatória possa ser comum nessa espécie.



REFERÊNCIAS

1. Bonney RC, Moore HDM, Jones DM. 1981. Plasma concentrations of oestradiol-17 β and progesterone, and laparoscopic observations of the ovary in the puma (*Felis concolor*) during oestrus, pseudopregnancy and pregnancy. J Reprod Fertil 63:523-31.
2. Brown JL, Wasser SK, Wildt DE, Graham LH. 1994. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. Biol Reprod 51:776-86.
3. Brown JL, Wildt DE, Graham LH, Byers AP, Collins L, Barrett S, Howard JG. 1995. Natural versus chorionic gonadotropin-induced ovarian responses in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) assessed by fecal steroid analysis. Biol Reprod 53:93-102.
4. Brown JL, Wildt DE, Wielebnowski N, Goodrowe KL, Graham LH, Wells S, Howard JG. 1996. Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. J Reprod Fertil 106:337-46.
5. Brown JL, Wildt DE. 1997. Assessing reproductive status in wild felids by non-invasive faecal steroid monitoring. Int Zoo Yb 35:173-91.
6. Brown JL, Graham LH, Wielebnowski N, Swanson WF, Wildt DE, Howard JG. Understanding the basic reproductive biology of wild felids through noninvasive faecal steroid monitoring. J Reprod Fertil (suppl) (no prelo).
7. CITES (1973) Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna, part of the Endangered Species Act (PL 93-205, 93rd Congress) and in 50 appendices. Code Fed. Reg., part 23.
8. Concannon PW. 1991. Reproduction in dogs and cats. In: P.T. Cupps, editor. Reproduction in domestic animals, 4th ed. New York: Academic Press. pp 517-54.
9. Crespo JA. 1982. Ecology of a mammal community in Iguazú National Park, Misiones. Rev. Mus. Argent. Cienc. Nat. "Bernardino Rivadavia", Ecol. 3(2):45-162.
10. Czekala NM, Durrant BS, Callison L, Williams M, Millard S. 1994. Fecal steroid hormone analysis as an indicator of reproductive function in the cheetah. Zoo Biol 13:119-28.
11. Fagen RM, Wiley KS. 1978. Felid paedomorphosis, with special reference to *Leopardus*. Carnivore 1:72-81.



12. Ferreira JCV. 1996. O Paraná e seus municípios. 1 ed. Maringá, Paraná: Editora Memória Brasileira. 728 p.
13. Graham LH, Goodrowe KL, Raeside JI, Liptrap RM. 1995. Non-invasive monitoring of ovarian function in several felid species by measurement of fecal estradiol-17 β and progestins. *Zoo Biol* 14:223-37.
14. Graham LH, Swanson WF, Brown JL. 2000. Chorionic gonadotropin administration in domestic cats causes an abnormal endocrine environment that disrupts oviductal embryo transport. *Theriogenology* 54:117-31.
15. Gudermuth DF, Newton L, Daels P, Concannon P. 1997. Incidence of spontaneous ovulation in young, group-housed cats based on serum and fecal concentrations of progesterone. *J Reprod Fertil* 51 (suppl):177-84.
16. Lawler DF, Johnston SD, Hegstad RL, Owens SF. 1993. Ovulation without stimulation in domestic cats. *J Reprod Fertil* 47:57-61.
17. Leopold, A.S. 1959. Wildlife of Mexico. Univ. of Calif. Press, Berkeley.
18. Mellen JD. 1989. Reproductive behavior of small captive exotic cats (*Felis* spp.). Doctoral thesis, University of California, Davis. 161 p.
19. Oba E. 1979. Aspectos histológicos e citológicos da mucosa vaginal de porcas durante as fases do ciclo estral. M.Sc. Dissertation, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. 58 p.
20. Oliveira TG. 1994. Status, conservation, and perspectives. In: Neotropical cats – ecology and conservation. São Luís: EDUFMA. pp 135-166.
21. Pantiff JA, Anderson DE. 1980. Breeding the margay at New Orleans Zoo. *Int Zoo Yearb* 20:223-4.
22. Patzl M, Schwarzenberger F, Osmann C, Bamberg E. 1998. Monitoring ovarian cycle and pregnancy in the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) by faecal progestagen and oestrogen analysis. *Animal Reproduction Science* 53:209-19.
23. Petersen MK. 1977. Behaviour of the margay. In: Eaton RL editor. The world's cats. Seattle: Carnivore Research Institute, University of Washington. pp 69-76.
24. Rengger, J.R. 1830. Naturgeschichte der Säugethiere von Paraguay. [Natural history of the mammals of Paraguay.] Basel.



25. Schmidt AM, Nadal LA, Schmidt MJ, Beamer NB. 1979. Serum concentrations of oestradiol and progesterone during the normal oestrous cycle and early pregnancy in the lion (*Panthera leo*). J Reprod Fertil 57:267-72.
26. Schmidt AM, Hess DL, Schmidt MJ, Smith RC, Lewis CR. 1988. Serum concentrations of oestradiol and progesterone, and sexual behaviour during the normal oestrous cycle in the leopard (*Panthera pardus*). J Reprod Fertil 82:43-9.
27. Schmidt AM, Hess DL, Schmidt MJ, Lewis CR. 1993. Serum concentrations of oestradiol and progesterone and frequency of sexual behaviour during the normal oestrous cycle in the snow leopard (*Panthera uncia*). J Reprod Fert 98:91-5.
28. Schramm RD, Briggs MB, Reeves JJ. 1994. Spontaneous and induced ovulation in the lion (*Panthera leo*). Zoo Biol 13:301-7.
29. Seal US, Plotka ED, Smith JD, Wright FH, Reindl N, Taylor RS, Seal MF. 1985. Immunoreactive luteinizing hormone, estradiol, progesterone, testosterone, and androstenedione levels during the breeding season and anestrus in Siberian tigers. Biol Reprod 32:361-8.
30. Shille VM, Stabenfeldt GH. 1979. Luteal function in the domestic cat during pseudopregnancy and after treatment with prostaglandin F_{2α}. Biol Reprod 21:1217-23.
31. Shille VM, Lundstrom KE, Stabenfeldt GH. 1979. Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17 beta concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. Biol Reprod 21:953-63.
32. Shille VM, Kollis GV, Thatcher MJ, Waterman S. 1991. Determination of reproductive status in the serval and bobcat using a validated, direct radioimmunoassay of fecal estradiol. Biol Reprod 44 (suppl):121 (abstr).
33. Tebet JM. 1999. Aspectos clínicos e fisiológicos do ciclo estral da jaguatirica (*Leopardus pardalis*, L. 1758). [Dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, SP, Brasil.
34. Tewes, ME. 1986. *Ecological and behavioral correlates of ocelot spacial patterns*. Ph.D. thesis, Univ. Idaho, Moscow.
35. [WHN] World Heritage Nomination. 1983. Parc National Iguazu. Direction des Parcs Nationaux.



36. Wildt DE, Kinney GM, Seager SWJ. 1977. Laparoscopy for direct observation of internal organs of the domestic cat and dog. *Am J Vet Res* 38:1429-32.
37. Wildt DE. 1980. Laparoscopy in the dog and cat. In: Harrison RM, Wildt DE, editors. *Animal Laparoscopy*. Baltimore (MD): Williams & Wilkins. p 31-72.
38. Wildt DE, Seager SWJ. 1980. Laparoscopic determination of ovarian and uterine morphology during the reproductive cycle (of the cat). In: Morrow D, editor. *Current therapy in theriogenology*. Philadelphia: Saunders. pp 828-32.
39. Wildt DE, Chan SYW, Seager SWJ, Chakraborty PK. 1981. Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. *Biol Reprod* 25:15-28.



3. Validação de um método de ensaio imunoenzimático (EIA) para determinação de estrógeno em fezes de pequenos felídeos

RESUMO

Um procedimento altamente sensível de ensaio imunoenzimático (EIA) para determinação de estrógeno (E2) em fezes de pequenos felídeos em microplacas foi validado. Para a validação do método referido, as mesmas amostras fecais foram processadas pelo método tradicionalmente empregado, o radioimunoensaio (RIA) e também através do EIA. As amostras fecais foram inicialmente analisadas para metabólitos de estrógeno de acordo com o método de RIA descrito por Brown et al. [1994], exceto que as amostras não foram secas antes da análise. As amostras foram descongeladas e aproximadamente 0,5 g de fezes, previamente bem misturadas, foram fervidas em 5 ml de etanol aquoso (90%) durante 20 min. Após centrifugação em 500g durante 10 min, o sobrenadante foi recuperado e o pélete ressuspendido em 5 ml de etanol 90%, turbilhonado ("vortex") por 1 min e recentrifugado. Os dois sobrenadantes de etanol foram combinados, evaporados completamente, dissolvidos em 1 ml de metanol e diluídos em solução salina-fosfato tamponada (0,01 M PO_4 , 0,14 M NaCl, 0,5% BSA, 0,01% NaN_3) antes da análise. Os radioimunoensaios foram validados para cada espécie através da demonstração: 1) paralelismo entre as curvas de inibição de ligação das diluições de extrato fecal e o padrão de esteróide apropriado; e 2) recuperação significativa (> 90%) do esteróide exógeno adicionado aos extratos fecais. A eficiência da extração de esteróides fecais variou de 90 a 100% como determinado pela recuperação de ^3H -estradiol adicionado antes da extração. Metabólitos de estrógeno foram medidos como descrito por Brown et al. (1994). O ensaio de estrógeno utilizou um anti-soro anti-estradiol-17 β , um "rótulo" de ^3H -estradiol-17 β e padrões de estradiol. A dose mínima detectável baseada em 90% de ligação máxima foi 5 pg/tubo. Os coeficientes de variação intra- e interensaio para ambos os ensaios foram <10%. Todas as concentrações hormonais fecais foram expressas baseadas em grama de peso fecal úmido. O método de EIA foi validado através da demonstração do paralelismo dos resultados com o RIA. Em comparação com o RIA, o EIA foi mais sensível. Em conclusão, além de ser não radioativo e de menor custo, o método



oferece várias vantagens sobre o procedimento convencional de RIA para estrógeno; essas são: (a) maior sensibilidade, (b) economia de tempo e trabalho, (c) uso mais econômico do anticorpo, (d) utilização de equipamento de menor custo, (e) não utilização de substâncias radioativas, evitando-se dessa forma riscos para quem processa as amostras, além da não produção de lixo radioativo.

Palavras-chave: esteróides fecais; monitorização não invasiva; atividade ovariana; felídeos; endocrinologia; estrógenos; ensaio imunoenzimático (EIA)



ABSTRACT

A highly sensible procedure of enzymeimmunoassay (EIA) for estrogen determination in feces of small felids was validated. For validation of the reported method, the same fecal samples were processed by the method traditionally employed, the radioimmunoassay (RIA) and also by the EIA. The fecal samples were initially analyzed for estrogen metabolites following the RIA method described by Brown et al. [1994], with the exception that the samples were not dried before analysis. The samples were defrosted and approximately 0.5 g of feces, previously well mixed, were boiled in 5 ml of aqueous ethanol (90%) during 20 min. After centrifuging at 500 g during 10 min., the supernatant was recovered and the pellet resuspended in 5 ml of 90 % ethanol, vortexed during 1 min. and recentrifuged. The two supernatants in ethanol were combined, completely evaporated, redissolved in 1 ml of ethanol and diluted in buffer-phosphate-saline (0.01 M PO₄, 0.14 M NaCl, 0.5% BSA, 0.01% NaN₃) before analysis. The radioimmunoassays were validated for each species by demonstration of: 1) parallelism between binding inhibition curves of fecal extract dilutions and the appropriate standard; and 2) significant recovery (> 90%) of exogenous steroid added to fecal extracts. The extraction efficiency of fecal steroids varied from 90 to 100% as determined by recovery of ³H-estradiol added before extraction. Estrogen metabolites were measured as described by Brown et al. (1994). The estrogen assay used an anti-estradiol-17 β anti-serum, a ³H-estradiol-17 β “label” and estradiol standards. The minimum detectable dose based in 90% of maximal binding was 5 μ g/tube. The intra- and inter-assay variation coefficients for both assays were <10%. All the fecal hormone concentrations were expressed based in gram of wet fecal weight. The EIA method was validated by parallelism demonstration of the results with RIA. Comparing with RIA, the EIA was more sensible. In conclusion, besides being non-radioactive and less expensive, the method offers many advantages in relation to the conventional RIA procedure for estrogen; these are: (a) higher sensibility, (b) work and time saving, (c) antibody use more economic, (d) equipment with lower cost, (e) non use of radioactive substances, avoiding by this way risks for people who process the samples, besides the non production of radioactive garbage.

Key words: fecal steroids; non-invasive monitoring; ovarian activity; felids; endocrinology; estrogens; enzymeimmunoassay (EIA)



INTRODUÇÃO

Atualmente, o método mais empregado para a dosagem de esteróides fecais em mamíferos é o radioimunoensaio, apesar de seu alto custo e do risco associado à utilização de substâncias radioativas. O ensaio imunoenzimático vem aparecendo como uma boa alternativa.

Comparando-se o ensaio imunoenzimático (EIA) com o radioimunoensaio (RIA), utiliza-se, no EIA, um marcador enzimático ao invés de um radioisótopo usado no RIA. Além disso, o EIA é mais barato, mais rápido, produz menos resíduo, não agride o meio ambiente, não requer licença e nem controle especial de resíduo e, pode ser utilizado em países onde o RIA é impraticável (A. Bellem, comunicação pessoal). No caso específico do ELISA ("*enzyme linked immunosorbent assay*"), o antígeno (ou o anticorpo) está ligado a uma fase sólida, isto é, placa de microtitulação.

Existem três tipos de EIA: (1) competitivo com anticorpo imobilizado, (2) competitivo com antígeno imobilizado e (3) EIA "sanduíche" com anticorpo duplo. As enzimas comumente usadas no EIA são: peroxidase de raiz forte (*horseradish peroxidase*), urease, fosfatase alcalina e β -galactosidase (A. Bellem, comunicação pessoal).

Para que um ensaio seja aplicado para uma nova espécie, ele deve ser validado, isto é, deve-se confirmar que o ensaio está medindo o que queremos. Os seguintes aspectos são analisados com o objetivo de validar-se um ensaio.

Especificidade / Reatividade cruzada (*crossreactivity*) é uma indicação de quanto o anticorpo liga-se a outros compostos presentes na amostra.

Paralelismo é uma forma de determinar se o ensaio está realmente medindo o que deve ser medido.

Acurácia (ou recuperação) representa a avaliação quantitativa do ensaio. É o grau em que a concentração medida corresponde à verdadeira concentração da substância, isso está relacionado à especificidade do ensaio.

Sensibilidade. O valor mais baixo de massa que pode ser estatisticamente discriminado de um tubo de ensaio contendo zero de hormônio.

O objetivo desse estudo foi avaliar a correlação entre ensaio imunoenzimático e radioimunoensaio para dosagem de estrógenos fecais em felídeo do gênero *Leopardus*.



MATERIAL E MÉTODOS

Espécie, Colheita de Amostras Fecais e Análises hormonais

O animal estudado foi uma fêmea de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), alojada individualmente no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional. Monitorização hormonal fecal não invasiva foi utilizada para quantificar metabólitos de estrógeno. A frequência das coletas nos recintos foi de cinco vezes por semana, nas segundas, terças, quartas, quintas e sábados, durante todo o período experimental. As amostras escolhidas foram sempre as mais recentes.

As amostras foram colocadas em pequenos sacos plásticos, rotuladas com a identificação do animal, espécie, data da colheita e local de procedência e armazenadas a aproximadamente -20°C , em *freezer* comum. Posteriormente essas amostras foram acondicionadas e transportadas em isopor contendo gelo seco, até o Laboratório de Reprodução do Centro de Conservação e Pesquisa (*Conservation & Research Center*), do *Smithsonian Institution*, localizado na cidade de *Front Royal*, Estado de *Virginia*, EUA (Fig. 1).

Foram utilizadas as mesmas amostras processadas pelo método descrito para o radioimunoensaio (ver Capítulo 2), com exceção de que para o enzimoimunoensaio (EIA) utilizou-se como tampão o *pink PBS* (que pode também ser utilizado para o radioimunoensaio).

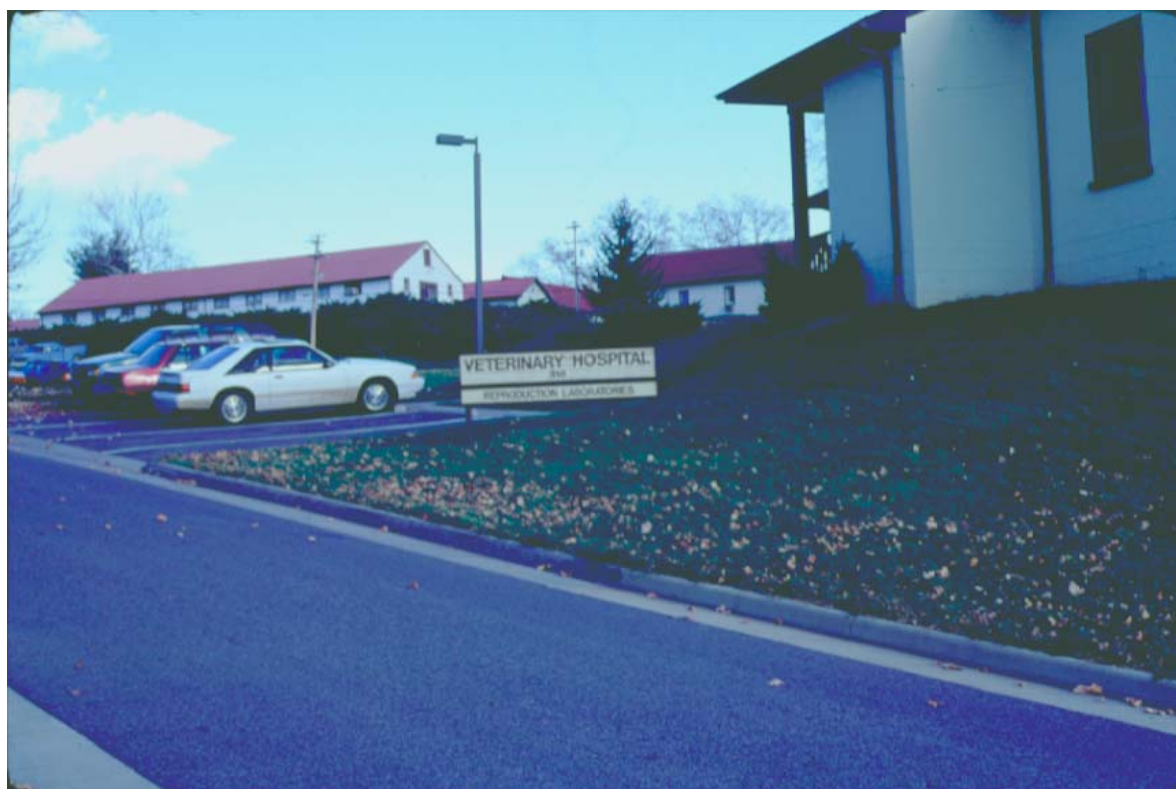


Fig. 1. Hospital veterinário do *Conservation and Research Center – Smithsonian Institution*, onde estão localizados os laboratórios de reprodução.



ENZIMOIMUNOENSAIO (EIA)

Neste experimento foi utilizado o EIA competitivo com anticorpo imobilizado (Fig. 2) com peroxidase de raiz forte (*horseradish peroxidase*, HRP) como marcador.

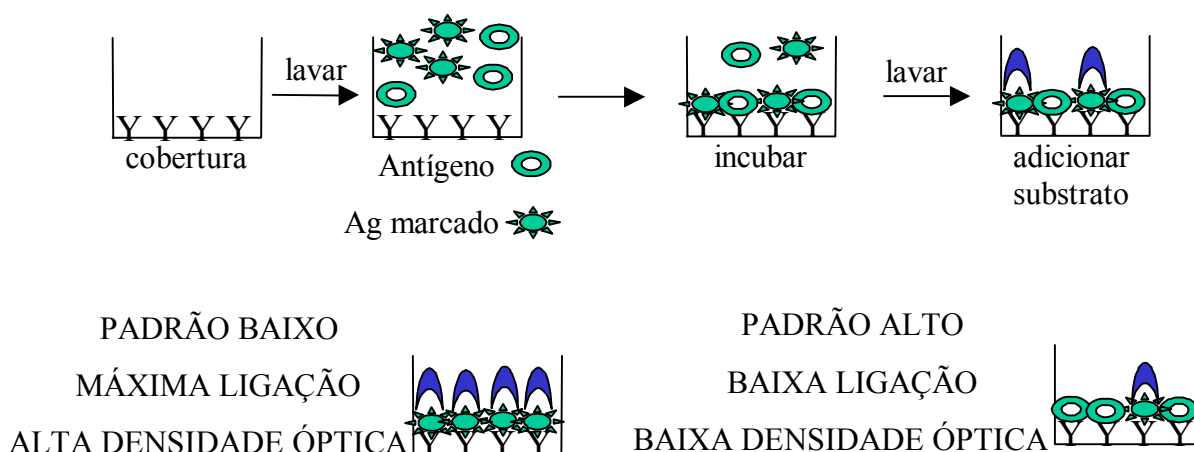


Fig. 2. Princípio do ensaio imunoenzimático (EIA) utilizado.

O procedimento geral foi o seguinte:

1. As placas⁴ (ver Anexos) foram cobertas¹⁶ com anticorpo (Ac). Um tampão carbonato/bicarbonato com pH 9,6 foi utilizado para cobrir as placas. A ligação do anticorpo à placa ocorre melhor em um pH básico.
2. Incubação, geralmente durante a noite a 4°C. Durante todos os períodos de incubação desse ensaio as placas foram cobertas para evitar-se a evaporação.
3. O excesso de anticorpo foi lavado. Foi utilizada solução salina com 0,05% de detergente (*Tween 20*) que reduz a ligação não específica (NSB, *non-specific binding*).
4. O bloqueio das ligações não específicas pode ser requerido. Utiliza-se BSA (soro albumina bovina), caseína ou gelatina de 0,1 a 1,0% em PBS.



5. Foram adicionadas as amostras¹⁸, os padrões e o antígeno marcado com HRP. Obs.: O HRP é sensível à azida, contaminação bacteriana e congelamento após a diluição em tampão. Os antígenos marcados e não marcados competem pelos sítios de ligação dos anticorpos. PBS de pH 7,0 com 0,1% BSA foi utilizado como tampão do ensaio. A ligação Ac/Ag ocorre melhor em pH neutro. Obs.: a adição de padrões/amostras e conjugado HRP é tempo-dependente e esse passo deve levar menos que 10 min. Uma segunda curva de padrões foi adicionada no final da placa para avaliar algum desvio devido ao tempo de adição.
6. Foi realizada incubação de 1 a 6 h em temperatura ambiente.
7. O excesso de Ac não ligado foi lavado da mesma forma que no passo 3.
8. O substrato (ABTS) e o catalisador (H_2O_2) foram adicionados e depois, utilizado o tampão citrato ou acetato de pH 4,0. A ligação do substrato é melhor em pH ácido.
9. Novamente, foi feita incubação de 0,5 a 1 h em temperatura ambiente.
10. Como opcional, nesse momento pode-se parar a reação com a solução de parada (azida ou H_2SO_4), o que permite que a placa possa ser lida qualquer hora. Essa opção não foi utilizada nesse experimento.
11. As placas foram agitadas para distribuir a cor de maneira uniforme e depois feita a leitura da densidade óptica (DO) em um espectrofotômetro para leitura de placa. Obs.: deve ser tomado cuidado de não se tocar o fundo dos poços das placas, já que a densidade óptica é lida através da placa e impressões digitais alteram as leituras.

Desenvolvimento do ensaio e otimização

Tempo e temperatura de incubação

- O tempo pode ser decrescido com o aumento da temperatura, mas a ligação AgAc e a ligação substrato-HRP tende a decrescer se a temperatura for muito alta. A temperatura ambiente de 20 a 25°C é melhor para esses passos. A cobertura de Ac da placa pode ser feita a 37°C por 4 a 6 h.
- Para otimizar a incubação do passo 6, foram tentadas 1, 2, 3, 4, 5, e 6 h para determinar quanto tempo demorava a reação para completar-se. A ligação máxima (padrão zero) nivela-se quando a reação está completa. Como a ligação máxima nivelou-se a 3 h, então a incubação de 3 h foi suficiente.



- Para otimizar o tempo de incubação do passo 9, a placa foi lida em intervalos de 5 min. A ligação 0 (zero) sai do nível, mas os padrões mais altos continuam a desenvolver, achatando a curva. Parou-se a reação ou a placa foi lida quando a curva padrão estava próxima à linear.

Otimização da diluição do anticorpo e do HRP

- Foram utilizados 0 (zero) e padrões médios e altos e variaram-se as diluições de Ac e HRP.
- O aumento da concentração de Ac ou HRP resulta em uma perda de sensibilidade (o final da curva em baixa concentração é chato).
- O decréscimo da concentração de Ac ou HRP resulta em perda de alcance (o final da curva em alta concentração é chato).

Ligação não específica (NSB, *non-specific binding*)

- Para os poços NSB, todos os reagentes foram adicionados a poços não cobertos.
- NSBs devem ser menores que 10% de ligação máxima.
- Podem ser reduzidos através de:
 - ❖ bloqueio com uma proteína após a cobertura de anticorpo;
 - ❖ adição de detergente ao tampão do ensaio;
 - ❖ aumento no número de lavagens.

Observações

- Extratos fecais, soro e urina podem afetar a ligação antígeno-anticorpo, a atividade enzimática e/ou o pH da solução;
- A amostra deve ser diluída em tampão caso a concentração hormonal seja suficientemente alta;
- Deve ser mantido o volume da amostra a aproximadamente 10% do volume total no poço;
- As amostras foram extraídas, secas e reconstituídas em tampão.

**Para calcular o ensaio:**

- porcentagem de ligação = (densidade óptica média do padrão/densidade óptica média do padrão 0) X 100;
- confrontar a porcentagem de ligação com a concentração do padrão em um eixo log;
- calcular a porcentagem de ligação das amostras e ler a curva padrão para determinar a concentração.

ENSAIOS

Os aspectos testados para os métodos de análise hormonal foram:

Especificidade / Reatividade cruzada: Representa quanto o ensaio mede outros hormônios além daquele para o qual o ensaio é específico. Para determinar a reatividade cruzada do anticorpo com outros hormônios, são feitas curvas de inibição de ligação. A reatividade cruzada com hormônios similares pode ser útil quando trabalha-se com várias espécies que podem produzir diferentes metabólitos do hormônio.

- Para determinar reatividade cruzada, mensura-se concentrações conhecidas de outros hormônios.
- % reatividade cruzada = (quantidade medida/quantidade adicionada) X 100. Por exemplo, adiciona-se 100 pg PdG (pregnanediol glicuronido) a um ensaio de progesterona, se ele medir 5 pg, a reatividade cruzada é 5%.
- Para fazer a curva paralela, as porcentagens de ligação de diferentes concentrações de hormônios comerciais purificados são confrontadas com as concentrações usadas. A massa indicada em 50% de ligação é lida para os diferentes hormônios, a razão dessas massas é a porcentagem de reatividade cruzada. A qualidade das determinações de reatividade cruzada é dependente do tipo e quantidade dos compostos testados. A reatividade cruzada é geralmente expressa como a dose relativa requerida para o deslocamento de 50% da ligação máxima do marcador como segue:

Reatividade cruzada = $\frac{\text{conc. do padrão testado necessário para causar 50\% de inibição}}{\text{conc. do competidor requerida para dar 50\% de inibição}} \times 100$

**Sensibilidade:**

- Representa a menor concentração detectada que é estatisticamente diferente de zero, isto é, a concentração mensurável mais baixa, geralmente o 1º padrão. Dito de outra forma, a sensibilidade pode ser definida como a concentração mínima detectável (CMD), que é a menor concentração da substância analisada que pode ser reconhecida (em um determinado nível de probabilidade) de uma amostra que não contenha a substância. Esse valor pode ser calculado como 2 desvios padrões da resposta média dos tubos vazios ou zero.
- Pode ser aumentada através do decréscimo da concentração do anticorpo ou de HRP, mas isso também diminuirá o alcance (*range*) do ensaio.

Acurácia:

- O teste de acurácia é feito através do ensaio de um volume constante (100 µl) dos padrões. Um tubo com 50 µl da amostra e 50 µl de tampão (o volume da amostra permanece constante, isto é, 100 µl), indicará a quantidade de hormônio desconhecida. Outro conjunto de padrões é processado. O segundo conjunto conterá 50 µl do padrão e 50 µl da amostra desconhecida. Através da subtração do tubo zero de cada padrão na segunda série, a massa/ml deve ser a mesma da primeira série de padrões.

Precisão:

- Intra-ensaio: dentro de um ensaio, isto é, a diferença entre duplicatas de uma amostra. Mede-se dois controles cruzados e abaixo em uma placa e calcula-se o coeficiente de variação (CV), deve ser menor que 10%.
- Inter-ensaio: entre ensaios, isto é, a diferença entre os valores para a mesma amostra quando processada em diferentes ensaios. Mede-se dois controles e calcula-se, o CV deve ser menor que 15%.

Paralelismo:

- Traça-se uma curva padrão. Um conjunto (*pool*) de amostras misturadas contendo altos níveis do hormônio de interesse (por exemplo, no caso de progesterona, utilizar amostras de fêmeas gestantes) é diluído com o mesmo fator de diluição como os padrões.



- A curva de ligação deve ser paralela à curva padrão, indicando que o hormônio amostrado é imunologicamente similar ao hormônio padrão.
- Se os valores padrão são (em ng/ml) 3,75; 7,5; 15; 30 e 60; então as diluições devem também seguir um fator 2, por exemplo, 1:32, 1:16, 1:8, 1:4, 1:2. Para todas as novas espécies, combina-se um número de amostras superior a um ciclo e dilui-se em série em múltiplos de 2 de 1:2 até 1:2048 e processa-se com uma curva padrão.
- A diluição da amostra é selecionada baseada em 50% de ligação.

Recuperação:

- Reforça-se uma amostra baixa (com baixa concentração) com padrão a 6 concentrações acima da variação da curva padrão e mede-se:
 - % recuperação = (quantidade medida / quantidade adicionada) X 100
 - deve ser próxima a 100%; se não for, indica interferência dos extratos fecais, que podem afetar a ligação antígeno-anticorpo, a atividade enzimática e/ou o pH das soluções.

HPLC:

- O último teste de um ensaio é feito com HPLC (*high pressure liquid chromatography*, cromatografia líquida de alta pressão). 200 µl do marcador são completamente desidratados, e reconstituídos em 55 µl de um conjunto (*pool*) de amostras misturadas. Segue-se o processamento através de HPLC. As frações são contadas para radioatividade e processadas (RIA). O pico de imunoreatividade deve coincidir com o pico radioativo.



RESULTADOS

Foram testadas 100 amostras e houve uma boa correspondência entre as concentrações de estrógenos fecais mensuradas através do ensaio imunoenzimático e do radioimunoensaio ($P < 0,01$). Os perfis de estrógenos excretados em fezes úmidas de gato-do-mato-pequeno são apresentados na Figura 3. A correlação global foi $r = 0,82$.

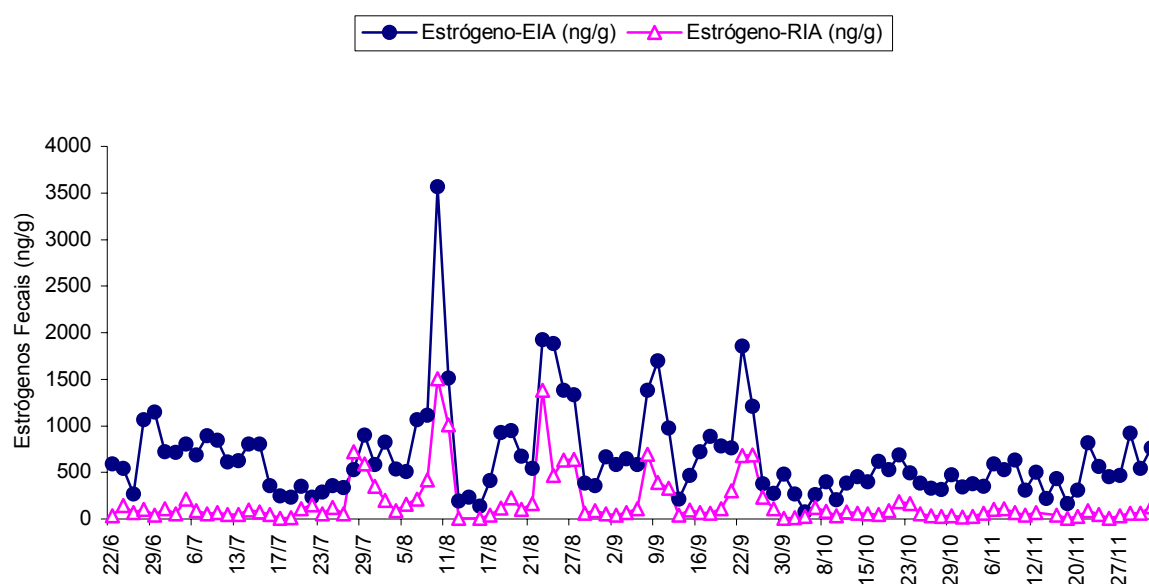


Fig. 3. Perfis da excreção fecal de estrógeno em fêmea adulta de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), segundo os métodos de ensaio imunoenzimático (EIA, círculos preenchidos) e radioimunoensaio (RIA, triângulos vazios).

A porcentagem de recuperação foi de 98,5% e a equação da reta obtida foi: $y = -4,3395 + 0,8716x$, onde y = concentração mensurada e x = concentração esperada.



DISCUSSÃO

O método de enzimoimunoensaio (EIA) foi validado através da demonstração do paralelismo dos resultados com o radioimunoensaio (RIA). Em comparação com o radioimunoensaio, o enzimoimunoensaio foi mais sensível porque obteve maiores concentrações, dessa forma indicando sua habilidade de detectar quantidades menores do hormônio.

A avaliação dos gráficos obtidos a partir dos resultados para sensibilidade e linearidade, tanto para RIA como para EIA, foi muito boa, com grande paralelismo entre as retas obtidas. A especificidade foi controlada através da leitura dos poços NSB (*non-specific binding*) e a especificidade / reatividade cruzada e a acurácia foram calculadas para o RIA e transpostas para o EIA.

Por não ser radioativo, o método não apresenta riscos tanto para quem processa as amostras bem como para o ambiente, pois não produz resíduos radioativos. Acrescenta-se ainda o menor custo quando comparado ao radioimunoensaio e outras várias vantagens sobre o procedimento convencional de RIA para estrógeno; essas são: (a) maior sensibilidade, (b) menos trabalho e economia de tempo, (c) uso mais econômico do anticorpo, (d) utilização de equipamento de menor custo.



CONCLUSÕES

1. O método de enzimoimunoensaio (EIA) é válido para a determinação de estrógenos em fezes de pequenos felídeos.
2. Em comparação com o radioimunoensaio, o método de enzimoimunoensaio foi mais rápido e menos trabalhoso, mais econômico no uso do anticorpo e utilizou equipamento de menor custo.
3. Pela não utilização de substâncias radioativas, o enzimoimunoensaio evita riscos tanto para quem processa as amostras como para o ambiente.



REFERÊNCIAS

1. Brown JL, Wasser SK, Wildt DE, Graham LH. 1994. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. Biol Reprod 51:776-786.



4. Efeitos das condições de cativeiro nos aspectos reprodutivos e adrenocorticais em fêmeas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e gato-maracajá (*Leopardus wiedii*)

RESUMO

Os efeitos das condições de cativeiro na atividade reprodutiva e adrenocortical foram caracterizados em fêmeas adultas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*; n = 3) e gato-maracajá (*Leopardus wiedii*; n = 2), mantidas individualmente em cativeiro no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional, Brasil. Todas essas fêmeas foram submetidas a três condições de recintos. Inicialmente, estavam alojadas em recintos grandes e ambientados (durante 3 meses), foram transferidas para recintos pequenos e vazios (por 6 meses) e, posteriormente, estes mesmos recintos foram ambientados (onde permaneceram por mais 6 meses). Alterações dos hormônios esteróides ovarianos e adrenocorticais foram monitoradas através da análise de metabólitos de esteróides em amostras fecais coletadas cinco vezes por semana. O radioimunoensaio (RIA) foi utilizado para progestágenos e corticóides, enquanto o enzimoimunoensaio (EIA) foi utilizado para estrógeno. Com base na observação de comportamento, o andar estereotipado foi mais intenso no período anterior à oferta de alimento para todas as gatas. Além disso, os animais de ambas as espécies apresentaram um padrão bimodal de comportamento ativo, com picos ao anoitecer e ao amanhecer durante todo o experimento. Comportamento agitado, caracterizado por andar estereotipado com alta frequência e duração, foi apresentado por todos os animais principalmente durante os três primeiros dias após a transferência para os recintos menores e sem ambientação. Com base nas análises hormonais, as fêmeas de gato-do-mato-pequeno apresentaram um decréscimo na atividade ovariana e um concomitante aumento nas concentrações de corticóides, que pode ser um indicativo do estresse induzido pela mudança de um recinto grande e ambientado, para um recinto pequeno e vazio. Verificou-se também que a ambientação dos recintos pequenos não foi suficiente para o retorno à atividade ovariana normal. As fêmeas de gato-maracajá apresentaram concentrações aumentadas de corticóides e pequena elevação da concentração média de estrógeno durante a segunda fase, retornando à concentração média inicial durante a terceira fase. As fêmeas de gato-do-mato-



pequeno apresentaram uma elevação bem pronunciada nas concentrações de corticóides após a transferência dos recintos grandes para os recintos pequenos. Essas altas concentrações de corticóides coincidiram com o comportamento agitado que todos esses animais apresentaram, especialmente nos primeiros três dias após a transferência de recinto. Este estudo mostra, pela primeira vez, ovulação espontânea em fêmeas de gato-do-mato-pequeno. De forma geral, esses resultados enfatizam a importância das dimensões e ambientação dos recintos e espera-se que forneçam subsídios para a melhoria do manejo e reprodução dessas espécies ameaçadas de extinção.

Palavras-chave: esteróides fecais; estrógenos; progestágenos; cortisol; monitorização não invasiva; estresse; reprodução; atividade ovariana; comportamento



ABSTRACT

The effects of captivity conditions on reproductive and adrenocortical activity were characterized in adult female tigrinas (*Leopardus tigrinus*; n = 3) and margays (*Leopardus wiedii*; n = 2) housed as singletons at the Itaipu Binacional Wildlife Conservation Center in Brazil. All females were subjected to three enclosures conditions. First, they were housed in large, enriched enclosures (for 3 months), secondly they were transferred to small and empty enclosures (for 6 months) and, thirdly, the small and empty enclosures were enriched (for 6 months). Changes in ovarian steroids and adrenocortical hormones were monitored by analyzing steroid metabolites in fecal samples. Samples were collected five times a week. Radioimmunoassay analysis (RIA) was used for progestogens and corticoids, while enzymeimmunoassay analysis (EIA) was used for estradiol. Based on observed behavior, stereotyped pacing was more intense prior to the feeding times for all cats. Also, both species displayed a bimodal pattern of behavioral activity, with peaks at nightfall and dawn throughout the experiment. Agitated behavior, characterized by high frequency and duration of stereotyped pacing, was exhibited by all animals mainly during the first three days after relocating them to the small and empty enclosures; this may only be the stress of moving which is commonly observed in cats. Based on hormonal analyses, tigrina females showed a decrease in ovarian activity and a concurrent increase in corticoid concentrations, which may be an indicator of stress induced by moving cats from a large, enriched enclosure to a small, empty one. It was also verified that enrichment of small enclosures was not sufficient to reinstate normal ovarian activity. Margay females showed increased corticoid concentrations and a small increase in estrogen mean concentrations during the second phase and returned to initial average concentrations during the third phase. Tigrina females had a very pronounced elevation in corticoids after transfer from big enclosures to small ones. The increased corticoids were associated with agitated behavior displayed by all cats, especially in the first three days after enclosure transfer. This study shows, for the first time, spontaneous ovulation in tigrina females. Overall these results emphasize the importance of enclosure dimensions and enrichment and, it is hoped that our findings could lead to improved management and reproduction of these threatened species.



Key words: fecal steroids; estrogens; progestogens; cortisol; non-invasive monitoring; stress; reproduction; ovarian activity; behavior



INTRODUÇÃO

Em 1936 Selye publicou um pequeno artigo intitulado “Uma Síndrome Produzida por Diversos Agentes Nocivos”, descrevendo pela primeira vez um padrão de reações fisiológicas em resposta a vários agentes danosos ou situações críticas, tais como injúrias, frio, infecções, intoxicações, queimaduras ou intenso exercício muscular (*apud* von Holst, 1998).

Um organismo responde a esses diferentes agentes estressantes com respostas estímulo-específicas, tais como respostas imunológicas a infecções ou com aumento de eritrócitos a déficits de oxigênio. Entretanto, não importa quão variável seja a natureza desses agentes estressantes, de acordo com Selye, eles sempre desencadeiam o mesmo padrão de respostas fisiológicas, que parecem representar um esforço generalizado do organismo para adaptar-se a uma nova situação. A resposta do organismo aos agentes estressantes é realizada em três estágios, que Selye chamou de *síndrome de adaptação geral* ou *síndrome do estresse*.

1. Reação de Alarme. As respostas iniciais a alterações fisiológicas induzidas por um agente estressante são involução timolinfática, ulceração gastrintestinal e perda de lipídios corticais e substâncias cromafins medulares das adrenais, indicando uma ativação dos sistemas simpático-adrenomedular e hipofisário-adrenocortical. Se o agente estressante for muito intenso (queimaduras severas, temperaturas extremas), pode resultar em morte dentro de poucas horas.

Entretanto, se o agente estressante não for tão intenso e tiver apenas um efeito breve, então geralmente não traz consequências posteriores para o organismo, que rapidamente retorna ao seu estado original.

2. Estágio de Resistência. Se o desafio persistir, o corpo adapta-se aos agentes estressantes toleráveis, tais como temperaturas baixas ou esforço físico inevitável, alterando seu estado fisiológico inteiro. De acordo com Selye, a atividade aumentada do córtex adrenal durante esse estágio de defesa ou resistência é de particular importância. O córtex adrenal adapta-se à produção aumentada e secreção de seus hormônios através de um aumento marcante em seu tamanho. Concomitante com isso, aquelas funções desnecessárias para enfrentar o agente estressante, tais como crescimento, **atividade gonadal** e resistência imunológica são suprimidas.



3. Estágio de Exaustão. Se o agente estressante for suficientemente severo e prolongado, os mecanismos de adaptação finalmente falharão e levarão o indivíduo à morte.

O estresse tolerável e de longa duração prejudica, portanto, a **fertilidade** e a vitalidade dos animais. Simultaneamente, as inicialmente vantajosas reações adaptativas físicas (particularmente, a produção aumentada de hormônios adrenocorticais) foram vistas por Selye a levar a numerosas doenças (referidas como “doenças de adaptação”), variando de pressão sanguínea alta e úlceras gástricas a diabetes e câncer (Selye, 1950, 1976, 1981).

De uma forma muito geral, Selye (1952) definiu estresse como “uma resposta não-específica do corpo a qualquer demanda feita sobre ele”. Em contraste com a suposição Selyana original, “não-específica” deve ser interpretada como aquelas reações desencadeadas no organismo que não são resultantes de alterações periféricas (ex. uma queda no açúcar sanguíneo ou na pressão arterial) e, portanto, representam mecanismos de correção da homeostase. Essa resposta não-específica é representada por padrões neuroendócrinos induzidos pelo sistema nervoso central, que alteram o estado fisiológico do organismo e portanto geralmente levam a sua ativação. Essas reações neuroendócrinas de estresse diferem dependendo da situação como também o comportamento dos animais e os concomitantes processos emocionais (Holst, 1998).

Essa definição de estresse não implica de forma alguma em padrões definitivos de reação ou participação de sistemas endócrinos específicos. Entretanto, ela assume reações fisiológicas que podem ser prejudiciais ao indivíduo caso atinjam intensidade suficiente ou forem de longa duração. A **fertilidade reduzida** também não é, automaticamente, uma consequência dessas reações de estresse (von Holst, 1998).

Marcadores fisiológicos do estresse

Um dos marcadores fisiológicos mais comumente empregados na avaliação da resposta ao estresse e atividade adrenocortical será brevemente discutido.

Glicocorticosteróides ou glicocorticóides. Esses hormônios são produzidos pela *zona fasciculata* do córtex da adrenal e são liberados imediatamente em situações de estresse. Os hormônios mais importantes e biologicamente relevantes são o cortisol e a corticosterona, cuja presença varia de espécie para espécie. Por exemplo, a corticosterona é o principal glicocorticóide encontrado no sangue de ratos e camundongos, o cortisol predomina em primatas e cobaias; enquanto outras espécies, tais como coelhos e hamsters dourados

Nei Moreira

CPGZOO / UFPR



(*Mesocricetus auratus*), freqüentemente produzem ambos os hormônios, embora estes estejam sujeitos à alteração diferencial durante o estresse (ex.: coelho: Kass et al., 1954; Krum & Glenn, 1965; hamster: Ottenweller et al., 1985). Devido aos seus efeitos intensos no metabolismo de carboidratos e proteínas, todos os hormônios da *zona fasciculata* do córtex adrenal são agrupados como glicocorticóides. Eles aumentam a produção de glicose a partir de proteínas e esta então é armazenada no fígado como glicogênio (um processo conhecido como gliconeogênese), dessa forma aumentando a glicose disponível necessária para os processos energéticos durante o estresse agudo. Além disso, eles inibem os processos inflamatórios e suprimem muitas respostas imunológicas, através de uma ação direta nos receptores do timo e das células sangüíneas. Finalmente, os glicocorticóides são requeridos para a ação das catecolaminas, tal como a indução da vasoconstrição pela noradrenalina (Beato & Doenecke, 1980; Munck et al., 1984).

A síntese e a liberação dos glicocorticóides são controladas pelo hormônio hipofisário ACTH (hormônio adrenocorticotrófico), que por sua vez é controlado pelo hormônio hipotalâmico liberador de corticotrofina (CRH). Segundo von Holst (1998), os efeitos agudos dos glicocorticóides incluem: mobilização de energia (gliconeogênese), lipólise (em sinergismo com as catecolaminas), aumento da contratilidade muscular (permissivo às catecolaminas), retenção de sódio e diurese, liberação de cálcio dos ossos, liberação aumentada de ácido clorídrico e pepsinogênio no estômago, ações antiinflamatórias e imunossupressivas, alteração da cognição e do limiar sensorial. A longo prazo (efeitos crônicos) podem ser observados os seguintes sinais clínicos: perda de massa muscular, fadiga, diabetes esteroideal, arteriosclerose, hipertensão, osteoporose, ulceração estomacal e duodenal, decréscimo da cicatrização de feridas, aumento da suscetibilidade a doenças, atrofia dendrítica (especialmente dos neurônios hipocampais), psicoses e depressão.

Altos níveis de glicocorticóides, tais como aqueles encontrados em indivíduos que sofrem estresse crônico, são conhecidos por causar severa atrofia dendrítica. Essa atrofia é particularmente notável nos neurônios hipocampais e pode contribuir para a dificuldade cognitiva encontrada em indivíduos persistentemente desafiados (Magarinos et al., 1996).

No âmbito da reprodução, os efeitos dos níveis elevados de glicocorticóides (leia-se estresse) incluem supressão da atividade gonadal, como efeito agudo, e decréscimo do comportamento sexual e esterilidade, como efeitos crônicos.



Um aspecto largamente negligenciado e que pode ser, particularmente, relevante na pesquisa do estresse é a relação entre níveis de hormônio livre e ligado à proteína. Na maioria dos estudos apenas a quantidade total de hormônios (ligada e não ligada) é determinada. A fração biologicamente ativa dos glicocorticóides é a fração livre. Ela afeta os tecidos e regula a liberação de glicocorticóides pelas adrenais, através de seus efeitos de retroalimentação (*feedback*) negativa nas estruturas hipotalâmicas e hipofisárias. A concentração sanguínea dessas proteínas, que ligam-se e transportam os hormônios, é geralmente restrita e pode ser saturada pelo aumento das concentrações hormonais.

Um decréscimo na concentração de proteínas de transporte, como consequência da mobilização protéica geral induzida pelos glicocorticóides, perda de peso corporal durante o estresse e/ou como consequência de níveis aumentados de testosterona, pode aumentar os níveis de hormônio livre, embora a concentração total de hormônios permaneça a mesma ou mesmo decresça (Blanchard et al., 1993; Bradley et al., 1980).

O estudo dos efeitos do estresse sobre a reprodução apresenta várias dificuldades. A natureza complexa de alguns agentes estressantes do ambiente expõe simultaneamente os animais a vários estímulos diferentes. Além disso, há uma variabilidade considerável entre indivíduos na resposta a um dado estímulo. Adiciona-se ainda, a destacada importância do sistema reprodutivo em passar genes para a próxima geração. Este último aspecto explica porque os animais têm desenvolvido várias estratégias para enfrentar problemas ambientais, incluindo respostas alternativas para compensar a falência de qualquer parte do mecanismo de proteção (Dobson & Smith, 2000).

Em resumo, há vários mecanismos regulatórios através dos quais os agentes estressantes regulam os mecanismos reprodutivos. Os sistemas endócrinos parecem ser uma forma ideal de coordenar essa regulação através de todo o organismo. Com o objetivo de desvendar a complexidade da subfertilidade induzida por estresse, é necessário estudar a reação a agentes estressantes de severidade repetível, primeiramente examinando respostas a estímulos claramente definidos, e então investigando a influência sobre os mecanismos reprodutivos (Dobson & Smith, 2000).



A ovelha é frequentemente utilizada como um modelo para a reprodução de mamíferos. Outro animal que pode ser utilizado para esses estudos, o rato, é muito pequeno para os estudos simultâneos propostos. Além disso, a secreção de gonadotrofina no rato é controlada por uma dependência espécie-específica da função adrenal circadiana, que limita a interpretação de observações relacionadas aos efeitos da atividade adrenal induzida por estresse na função reprodutiva (Dobson & Smith, 2000).

O aumento da duração do fator estressante (transporte ou hipoglicemia) não prolonga a resposta de cortisol na mesma magnitude (Dobson & Smith, 2000). Além disso, se o transporte é repetido toda semana ou em intervalos maiores, não há redução na resposta de cortisol total. Entretanto, se o transporte é repetido diariamente, algumas ovelhas têm respostas reduzidas após quatro viagens (R.F. Smith & H. Dobson, comunicação pessoal). Diferenças individuais na resposta podem ser devidas a experiências pré-natais ou em uma fase precoce da vida (Lay et al., 1997; Liu et al., 1997) ou de origem genética (Romeyer & Bouissou, 1992).

Como os estímulos estressantes afetam a reprodução?

Na fase folicular de um ciclo estral normal, o padrão fisiológico de secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) do hipotálamo promove um aumento da liberação pulsátil do hormônio luteinizante (LH) pela glândula pituitária (Moenter et al., 1990). Com relação ao hormônio folículo-estimulante, esse dita a taxa de crescimento folicular e a produção de estradiol, ultimamente levando a uma onda pré-ovulatória de LH e ovulação (McNeilly et al., 1991).

Com a finalidade de se obter uma onda de LH perfeitamente sincronizada, uma série de eventos perfeitamente controlados deve ocorrer no interior do hipotálamo e da glândula pituitária. Após a remoção dos efeitos supressivos da progesterona durante a luteólise, os pulsos de GnRH (e assim o LH) são secretados com frequência aumentada, para culminar eventualmente na secreção contínua no início da onda de LH em resposta aos efeitos de retroalimentação positiva do estradiol (Evans et al., 1995).



O transporte por 4 ou 8 h reduz a frequência e a amplitude dos pulsos de LH, especialmente nas primeiras horas em ovelhas ovariectomizadas ou animais intactos durante a fase folicular tardia (Dobson et al., 1999b; Phogat et al., 1999).

Claramente, a ativação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal por agentes estressantes reduz a característica pulsátil de GnRH/LH através de ações em ambos hipotálamo e glândula pituitária, ultimamente privando o folículo ovariano de adequado suporte de LH. Isso levará a uma produção reduzida de estradiol por folículos de crescimento mais lento. Tal hipótese é suportada pelo marcado decréscimo na secreção de estradiol observado após a redução da frequência de pulsos exógenos de LH que comandam o crescimento folicular em um modelo de ovário autotransplantado (Dobson et al., 1999a).

Uma combinação dos efeitos acima na característica pulsátil do LH, a nível hipotalâmico e pituitário contribui, sem dúvida, para o retardo e redução da magnitude da onda de LH, observada após transporte durante a fase folicular (Dobson et al., 1999c). Esse efeito no mecanismo de controle da onda de LH pode ser exercido diretamente via influência do GnRH na produção de seus próprios receptores ou, indiretamente, através da redução induzida no estradiol que, por sua vez, irá alterar o balanço dos sistemas que controlam a liberação da onda de LH. Assim, o estresse tem revelado outro nível de interferência (no ovário), como parte de seus efeitos múltiplos nos mecanismos de controle reprodutivo (Dobson & Smith, 2000).

Um local chave para as alterações exercidas por estímulos estressantes parece ser o controle neuronal da secreção de GnRH. Estudos foram recentemente realizados sobre os efeitos de dois neurotransmissores reguladores e os resultados preliminares são muito interessantes. A infusão do antagonista opióide naloxone, antes da administração de insulina, impediu o retardo no início da onda de LH, observado após a administração de apenas insulina. Isso claramente demonstra a participação de opióides na mediação das alterações induzidas por estresse na secreção de LH. Além disso, parece que os receptores para progesterona / glicocorticóide não estão envolvidos na interação entre o estresse e os eixos reprodutivos porque o antagonista RU486 foi incapaz de reverter os retardos induzidos por insulina na onda de LH (Dobson & Smith, 2000).



A ligação entre a baixa frequência de pulsos de LH induzida por estresse e casos de subfertilidade

No interior do folículo em crescimento, o ovócito mantém contato direto com as células da granulosa por projeções celulares através da zona pelúcida (Moor et al., 1980). Assim, eventos que influenciem a integridade da função folicular podem ter efeitos diretos na viabilidade do ovócito. Esses efeitos não são sempre imediatamente óbvios, por exemplo, sabe-se que RNAs mensageiros são depositados no núcleo do ovócito mas não traduzidos até o estágio de oito células de desenvolvimento do conceito (Staigmiller & Moor, 1984). Conseqüentemente, qualquer evento que altere a atividade das células da granulosa pode influenciar as taxas de prenhez. Além disso, Mihm et al. (1994) forneceram evidências para as taxas reduzidas de prenhez após o prolongamento da duração da fase folicular através de um retardamento artificial do início da onda de LH.

Acredita-se que em algumas situações, tais como durante o estresse crônico de uma claudicação mais severa ou febre, a frequência de pulsos de GnRH / LH será tão baixa que o crescimento folicular inicial ocorrerá, mas será incapaz de continuar nos estágios subseqüentes que dependem de frequências de pulsos mais rápidas. Dessa forma, o animal falhará em manter ciclos estrais e o anestro conseqüente será reconhecido.

Em situações levemente menos estressantes, a frequência de pulsos de GnRH / LH poderá ser apenas rápida o suficiente para suportar o crescimento folicular, mas pelo fato de estar no limiar, estará suscetível à interrupção ou variação por estímulos que de outra forma seriam inócuos. Nesse caso, a integridade das células da granulosa pode ser comprometida e assim também o ovócito e, embora o cio e a fertilização possam ocorrer, o conceito falhará em desenvolver-se, não resultando em prenhez. Isso se reflete na subfertilidade insidiosa idiopática reconhecida por quem trabalha com esses animais.



Condições de cativeiro como causas de comportamentos estereotipados

O padrão de atividade de uma espécie é considerado como uma adaptação às influências ambientais (Beltran & Delibes, 1994) e é base importante para a compreensão do comportamento. Conseqüentemente, tais estudos de comportamento podem resultar em elementos importantes no manejo em cativeiro com sucesso de uma espécie (Stevens and Hutchins, 1993; Kleiman, 1994). Eles podem ser mesmo críticos no desenvolvimento de estratégias efetivas de conservação para muitas espécies. Estudos de animais em vida livre são freqüentemente impedidos pela dificuldade da observação direta dos animais (Emmons, 1988; Law et al., 1997). Isso é especialmente verdade com felídeos. Dessa forma, o estudo científico de felídeos cativos pode não apenas fornecer sugestões (informações, dados, etc.) para melhoria no manejo em cativeiro, como também pode auxiliar na conservação dos felídeos selvagens (Law et al., 1997).

O tamanho mínimo de recintos para manutenção de pequenos felídeos em cativeiro, segundo recomendação da Associação Americana de Zoológicos e Aquários (AZA), é calculado com base no peso dos animais: menores que 10 kg (22 lb) e entre 10 e 20 kg (22-44 lb). O espaço mínimo recomendado por animal é o seguinte:

<10 kg = 2 X 2 X 2,5 m (largura X comprimento X altura)

<20 kg = 4 X 2 X 2,5 m (largura X comprimento X altura)

Para cada animal a mais, deve aumentar-se a superfície em 50%. As espécies terrestres necessitam mais espaço que as arborícolas. O gato-do-mato-pequeno é terrestre e arborícola, pois alimenta-se na natureza tanto de pequenos mamíferos (roedores) como passeriformes (Gardner 1971, Mondolfi 1986). O gato-maracajá parece ser a espécie mais arborícola do gênero *Leopardus*, pois um estudo realizado em Belize encontrou como item mais comum na dieta um pequeno rato arborícola. Sendo assim, o gato-maracajá forrageia principalmente em árvores, porém utiliza o chão para maiores deslocamentos (Konecny, 1989). A jaguatirica possui hábitos terrestres e arborícolas, pois caça principalmente animais terrestres mas descansa nas árvores durante o dia (Sunquist et al., 1989; Emmons, 1988).



Enriquecimento ambiental é um princípio que procura melhorar a qualidade dos cuidados com o animal em cativeiro, através da identificação e provisão de estímulos ambientais, necessários para o ótimo bem-estar psicológico e fisiológico (Shepherdson, 1998).

O termo **estereótipo** refere-se ao comportamento que é caracteristicamente repetitivo, invariável na forma e sem objetivo óbvio ou função (Odberg, 1978). Estereótipos desenvolvem-se em uma grande variedade de situações e através de uma ampla gama de espécies, incluindo humanos e são heterogêneos em origem, causa próxima e aparência (Mason, 1991a). A generalização mais ampla que se pode fazer sobre as causas da estereotipia é que elas são resultado de uma interação organismo-ambiente anormal.

Alguns tipos de estereótipos parecem originar-se em resposta a condições patológicas do organismo, tais como defeitos congênitos, desenvolvimento anormal ou desordens de mecanismos processadores de estímulos de ordem superior. Por exemplo, o estereótipo pode desenvolver-se em humanos que possuem severo retardamento mental, autismo, esquizofrenia e dependência de drogas. Animais criados em isolamento ou privados de estímulos necessários para o desenvolvimento, podem desenvolver estereótipos direcionados a eles mesmos, tais como sucção de dedos, balanço e "auto-abraço" como, freqüentemente, observado em primatas de laboratório (Berkson, 1967). Muitos outros tipos de estereotipia são ambientalmente induzidos, desenvolvendo-se em situações onde o animal é normal, mas o ambiente em que vive está de alguma forma inferior ao ótimo. Esses são, algumas vezes, referidos como "estereótipos de jaula" (Ridley & Baker, 1982) e são provavelmente o tipo mais comum observado em animais de zoológico. Holzapfel (1938) foi uma das primeiras pesquisadoras a descrever alguns dos padrões comportamentais que se desenvolvem em movimentos repetitivos em animais de zoológico e, em quais situações esse comportamento é desencadeado.



A função do comportamento estereotipado em animais cativos é um assunto amplamente debatido. Uma hipótese considerada viável é a de que a realização do comportamento estereotipado ameniza, fisiologicamente ou psicologicamente, um ambiente sub-ótimo. Estereótipos desenvolvem-se freqüentemente em situações conhecidas, por evidências comportamentais independentes e fisiológicas, como aversivas e estressantes, tais como baixos níveis de estímulos, contenção física, inabilidade para escapar de situações que provocam medo, ou frustração (Mason, 1991b). Por essa razão, o comportamento estereotipado tem sido considerado, há bastante tempo, como indicativo de condição ambiental inadequada (Broom, 1983; Wiepkema, 1983). A hipótese maior de estereótipos mantém que o comportamento estereotipado é uma resposta a condições aversivas ou estressantes e que, de alguma forma, a realização de estereótipos reduz o nível de estimulação que o animal experimenta (revisado por Mason, 1991a,b).

Estilos comportamentais individuais desempenham um papel importante em determinar que indivíduos desenvolverão estereotipia (Schouten et al., 1991). Podemos apenas concluir que, de forma geral, a origem da estereotipia é complexa e uma variedade de razões funcionais pode ser responsável pelo desenvolvimento desses comportamentos (Carlstead, 1998).

Em zoológicos, onde os animais são exibidos, o comportamento estereotipado é um problema, porque transmite ao público a inadequação do animal à condição de cativeiro. Enquanto muitas questões funcionais sobre a estereotipia ainda não podem ser satisfatoriamente respondidas, sabemos que o enriquecimento ambiental apropriado freqüentemente reduzirá a estereotipia em animais confinados que foram normalmente criados (Hediger, 1950; Morris, 1962).

Os padrões comportamentais primários são freqüentemente apetitivos; isto é, são atividades que um animal realiza em um ambiente natural quando está procurando algum estímulo externo em particular. Exemplos incluem busca de alimento, procura por parceiro, escape para um local seguro, ou busca de distância ou espaço de co-específicos.

A estereotipia é amplamente distribuída e comum em carnívoros. Evidências apresentadas em ursos, felídeos, raposas feneco (*Vulpes zerda*) e visões (*Mustela vison*) indicam que a estereotipia em uma determinada espécie pode variar qualitativamente ou temporalmente e, que essas variações indicam diferentes humores ou motivação (Carlstead, 1998).



Se olharmos no padrão temporal de 24 h de comportamentos estereotipados em relação à alimentação em carnívoros de zoológico mantidos em recintos tradicionais e com métodos de alimentação tradicionais, um padrão similar de atividades terminais e interinas pode ser discernido em muitos casos. Por exemplo, tais dados no andar estereotipado de cada uma das quatro espécies de felídeos em recintos externos no Zoológico Nacional de Washington, D.C. - onça-pintada (*Panthera onca*), puma (*Puma concolor*), leopardo (*Panthera pardus*) e serval (*Leptailurus serval*) - mostraram que o andar ocorria principalmente antes e durante as horas em que os tratadores colocavam comida no recinto. Pumas, e servais em menor grau, mostraram outro pico em andar no final da tarde. O visão ("ranch mink"), um urso negro americano (*Ursus americanus*) e um gato-do-mato-grande (*Oncifelis geoffroyi*) apresentaram padrões similares de estereotipia, com picos entre zero e três horas antes da alimentação diária, com um pico secundário dez horas após a alimentação para o visão (de Jonge et al., 1986) e em vários períodos durante a tarde e noite para o urso e gato (Carlstead, 1998).

A implicação é que, como em experimentos de laboratório, animais de zoológico em um esquema regular de fornecimento de alimento podem estar exibindo estereótipos do tipo "antecipação ao alimento" que correspondem a atividades terminais induzidas por rotina. Também, o mesmo indivíduo ou espécie pode expressar outros, estereótipos não relacionados à comida entre as alimentações (atividades interinas). Estudos mais detalhados de estereotipia seriam úteis para delinear os componentes motivacionais de comportamentos anormais e repetitivos, como também para enfatizar a necessidade de serem modificadas as práticas tradicionais de alimentação que são altamente previsíveis e que não fazem parte do comportamento normal do animal (Carlstead, 1998).

Um exemplo de como o enriquecimento pode fornecer estímulos ambientais que os animais são motivados a procurar, como indicado por seu comportamento estereotipado, foi um experimento com quatro gatos-leopardo (*Priailurus bengalensis*) individualmente alojados. Quando mantidos em um recinto vazio em uma construção que também mantinha leões (*Panthera leo*), tigres (*Panthera tigris*) e pumas, os níveis de estresse (mensurados pelo cortisol urinário) e a frequência de andar estereotipado estavam cronicamente elevados nesses gatos. Quando o recinto vazio foi enriquecido com vários cepos ocos, caixas, troncos e plataformas, os níveis de cortisol e o andar estereotipado decresceram significativamente. A hipótese apresentada foi a de que o estresse e o andar estereotipado foram reduzidos, devido ao fato dos gatos não disporem anteriormente de locais para se esconderem na presença de potenciais predadores como os outros grandes felídeos vizinhos (Carlstead et al., 1993). Especulou-se que o comportamento de se esconder motivado por "medo", pôde ser consumado quando o fator ambiental, pelo qual os gatos estavam procurando, foi fornecido (Carlstead, 1998).

Para o enriquecimento ambiental, métodos mais naturalísticos de oferta de alimento envolvem esconder a comida e fazer com que os animais trabalhem para obtê-la. Há muitos exemplos disso na literatura, e desde o início dos anos 80 (Hancocks, 1980; Hutchins et al., 1984) essa prática tem sido gradualmente encorajada no manejo de animais de zoológico.

O objetivo geral deste estudo foi correlacionar o potencial estresse induzido por alterações nas condições de cativeiro com a atividade ovariana para gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá.

O objetivo específico foi correlacionar resultados de níveis de hormônios reprodutivos (estrógenos e progestágenos) e atividade adrenocortical (corticóides) com observações de comportamento, sob condições de recintos pequenos e vazios e de recintos grandes e ambientados.



MATERIAL E MÉTODOS

Local, Animais e Recintos

O trabalho foi desenvolvido com animais alojados individualmente no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB), localizado no Refúgio Biológico Bela Vista, às margens do Lago de Itaipu, na cidade de Foz do Iguaçu, Estado do Paraná.

Foram utilizadas fêmeas adultas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, n = 3) e gato-maracajá (*Leopardus wiedii*, n = 2). Código de identificação individual, categoria reprodutiva e idade estimada são apresentados na Tabela 2. Cada fêmea foi categorizada como procriadora caso tivesse produzido filhote ou não-procriadora se não tivesse parido após ter sido colocada com um macho no mínimo uma ocasião. Duas fêmeas de gato-do-mato-pequeno eram nascidas em cativeiro e todas as outras fêmeas provenientes da natureza. Todos os animais estiveram expostos a condições naturais de iluminação. Os recintos grandes e ambientados foram os normalmente utilizados para fêmeas de pequenos felídeos no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional, assim como para recintos menores foram utilizados os Recintos do Setor Extra.

TABELA 1. Informação geral sobre as fêmeas de gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá utilizadas neste estudo

Código do animal	Espécie	Idade (anos)	Categoria reprodutiva ^a	Procedência
Lti-1505	Gata-do-mato-pequeno 1	2,0	ND	Cativeiro
Lti-205	Gata-do-mato-pequeno 2	>8,5	P	Natureza
Lti-1058	Gata-do-mato-pequeno 3	6,0	P	Cativeiro
Lwi-1242	Gata-maracajá 1	>5,0	ND	Natureza
Lwi-189	Gata-maracajá 2	>8,5	ND	Natureza

^aP, procriadora; N, não procriadora; ND, não determinado.

As medidas internas dos recintos grandes utilizados para *Leopardus tigrinus* foram as seguintes: comprimento 6,92 m; largura 2,87 m e altura 2,55 m; recintos estes que continham um cambiamento quadrado com largura, comprimento e altura iguais a 1,45 m (medidas externas). Os recintos grandes utilizados para *Leopardus wiedii* possuíam as seguintes medidas: comprimento 7,00 m; largura 2,95 m; altura 4,15 m, contendo um cambiamento no seu interior com largura de 1,06 m, comprimento de 1,19 m e altura de 1,07 m (medidas externas). As medidas internas dos recintos pequenos que foram utilizados para ambas as espécies são as seguintes: largura 1,61 m; comprimento 3,43 m e altura 2,0 m.

Alimentação dos Animais

Foram alimentados principalmente com carne bovina e suplementação mineral e vitamínica (ver ANEXOS). As dietas foram suplementadas ocasionalmente com presas inteiras (rato, peixe e frango). Todos os animais foram alimentados diariamente, sem dia de jejum.

Análises Hormonais

Monitorização hormonal fecal não invasiva foi utilizada simultaneamente para quantificar metabólitos de corticóides adrenais (corticosterona) e hormônios reprodutivos (estrógeno e progesterona).

Para as análises hormonais através de amostras de fezes coletadas nos recintos, a frequência das coletas foi de cinco vezes por semana, nas segundas, terças, quartas, quintas e sábados, durante todo o período experimental. As amostras escolhidas foram sempre as mais recentes.

As amostras foram colocadas em pequenos sacos plásticos, rotuladas com a identificação do animal, espécie, data da colheita e local de procedência; e armazenadas a aproximadamente -20°C, em *freezer* comum. Posteriormente essas amostras foram acondicionadas e transportadas em isopor contendo gelo seco, até o Centro de Conservação e Pesquisa (*Conservation & Research Center*), do *Smithsonian Institution*, localizado na cidade de *Front Royal*, Estado de *Virginia*, EUA.



O método utilizado para extração dos metabólitos de esteróides fecais foi simplificado de uma técnica descrita por Wasser *et al.* (1991, 1993) para o babuíno. As amostras foram analisadas para dosagem de metabólitos de progestágeno e corticóides de acordo com o método descrito por Brown *et al.* (1994), exceto que as amostras não foram secas antes da análise. As amostras foram descongeladas e bem misturadas antes da extração de esteróide. Os esteróides foram extraídos através da fervura de aproximadamente 0,5 g de fezes úmidas em 5 ml de etanol aquoso (90%) durante 20 min. Após centrifugação a 500g durante 10 min, o sobrenadante foi recuperado e o pélete ressuspensionado em 5 ml de etanol 90%, turbilhonado ("vortex") por 1 min e re-centrifugado. Os sobrenadantes de etanol foram combinados, evaporados completamente, dissolvidos em 1 ml de metanol e diluídos em solução salina-fosfato tamponada (0,01 mol/L fosfato, 0,14 mol/L NaCl, 0,5% albumina sérica bovina, 0,01% NaN₃) antes da análise. Os radioimunoensaios foram validados para cada espécie através da demonstração: 1) paralelismo entre as curvas de inibição de ligação das diluições de extrato fecal e o padrão de esteróide apropriado; e 2) recuperação significativa (> 90%) do esteróide exógeno adicionado aos extratos fecais diluídos. A eficiência da extração do esteróide variou de 90 a 100% como determinado pela recuperação de ¹⁴C-progesterona adicionada à amostra fecal antes da extração. Os metabólitos de progestágenos foram quantificados através de um anti-soro anti-progesterona monoclonal, um marcador ¹²⁵I-progesterona e padrões para progesterona. A sensibilidade do ensaio foi de 5 µg/tubo. Todas as concentrações hormonais fecais estão expressas com base em peso fecal úmido por grama.

A dosagem de corticóides foi realizada através de radioimunoensaio com a utilização de um "kit" comercial.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO PARA CORTICÓIDES

A. PREPARAÇÕES DO ENSAIO

- (1) Os reagentes foram colocados em temperatura ambiente antes da utilização.
- (2) Tubos-teste de vidro 10 X 75 mm foram identificados consecutivamente em duplicata para as amostras. Foram também identificados tubos em duplicata para: NSB (*non-specific binding*), 0 (zero), CL (*control low*), CH (*control high*).
- (3) Soluções foram adicionadas na ordem indicada no protocolo. Todos os reagentes foram pipetados diretamente dos frascos originais.

Nei Moreira

CPGZOO / UFPR



B. PASSOS DO ENSAIO

- (1) As amostras foram diluídas (diluição variável conforme a espécie) com o diluente para esteróides (*steroid diluent*) até um volume de 2 ml.
- (2) Foram adicionados 150 µl do diluente para esteróides aos tubos NSB.
- (3) Foram adicionados 50 µl do diluente para esteróides aos tubos 0 ("tubos zero").
- (4) Foram adicionados 50 µl dos calibradores para corticosterona* (padrões, 25 ng/ml - 1000 ng/ml) aos tubos respectivos.

NOTA: *As concentrações dos calibradores são expressas como equivalente sérico e já têm incluído o fator de diluição. Os resultados podem ser lidos diretamente da curva de calibração se a diluição recomendada (1:200) é seguida.

- (5) Foram adicionados 50 µl dos controles diluídos (1:200) e das amostras diluídas (diluição variável conforme a espécie) aos tubos previamente identificados.
- (6) Foram adicionados 100 µl de CORTICOSTERONE¹²⁵I (reagente azul) a todos os tubos.
- (7) Foram adicionados 100 µl de ANTI-CORTICOSTERONA (reagente amarelo) dos tubos 0 (tubos zero) ao final do ensaio.

NOTA: Não pode ser adicionado anti-soro aos tubos NSB.

- (8) Todos os tubos do ensaio foram agitados e incubados à temperatura ambiente (22-25°C) por 2 h.
- (9) Após a incubação, foram adicionados 250 µl de solução precipitante (PRECIPITANT SOLUTION, reagente vermelho) a todos os tubos.
- (10) Os tubos foram agitados (*vortex*) completamente.
- (11) Todos os tubos do ensaio foram centrifugados a 3000 rpm (1000 g) durante 25 min. O sobrenadante foi decantado. (Foi tomado o cuidado de secar a borda dos tubos teste em papel absorvente, antes de retorná-los à posição original).
- (12) O precipitado foi contado no contador gama (*gamma counter*³).



Avaliação dos dados

Os dados foram analisados e comparados com resultados obtidos em estudo de hormônios esteróides reprodutivos e atividade ovariana em felídeos do gênero *Leopardus* (Capítulo 2). Os padrões individuais de comportamento foram correlacionados com os níveis de metabólitos fecais mensurados.

Os valores médios de concentrações de estrógenos fecais são apresentados como média \pm SEM (erro padrão). Aumentos significantes nas concentrações de estrógeno fecal em cada fêmea foram determinados por um processo em que inicialmente os altos valores que excediam a média + 1,5 desvio padrão (SD) foram excluídos. Os valores de nível basal foram determinados após todos os valores altos terem sido excluídos. A concentração mais alta dentro de um grupo de valores altos foi considerada como pico. A duração do ciclo estral foi calculada como o número de dias entre picos na concentração de estrógeno (presumida estar associada com estro, ver Capítulo 2) por períodos não excedentes a 40 dias (ou seja, superiores a duas vezes a duração média estimada para o ciclo estral do gato-maracajá: Mellen, 1989; Fagen & Wiley, 1978; Pantiff & Anderson, 1980; Petersen, 1977). Intervalos entre picos de estrógeno superiores a 60 dias foram considerados como períodos de anestro. A duração do estro foi calculada com base no número de dias em que o estrógeno estava elevado acima do nível basal (indicativo de estro). O início da onda de estrógeno foi determinado por um valor que excedia os valores precedentes em 50%. As concentrações basais de metabólitos de progestágeno foram calculadas, no caso de fêmeas que ovularam, a partir dos valores que precediam as ondas de estrógeno pré-ovulatórias e após o retorno aos valores basais. Os aumentos pós-ovulatórios na excreção de metabólitos de progestágeno foram considerados significantes no caso em que os valores excederam a média + 2 SD dos valores precedentes e permaneceram altos durante no mínimo uma semana. Médias semanais foram calculadas para cada fêmea individualmente e então calculadas para fornecer as respectivas médias de grupo.



Os dados de estrógenos e corticosterona foram normalizados através da aplicação do logaritmo com base 10 e testados para normalidade utilizando-se o Teste Shapiro-Wilk. As médias dos dados foram então calculadas por fases da seguinte forma: primeira (recintos grandes e ambientados), segunda (recintos pequenos sem ambientação) e terceira (recintos pequenos ambientados). A homogeneidade das variâncias dos grupos (após a normalização) foi testada aplicando-se o Teste de Bartlett ($\alpha = 0,05$). Comparações estatísticas dos resultados foram testadas utilizando-se análise de variância (*Oneway Anova*), seguida por comparações para todos os pares usando-se o teste de Tukey-Kramer HSD ou para cada par usando-se o teste t de Student ($\alpha = 0,05$). Todas as análises foram realizadas com os programas de *software* JMP [SAS Institute Inc., Versão 4.0, 2000], Microsoft® Excel 2000 [Microsoft Office, 2000] e STATISTICA for Windows (*StatSoft Inc., Release 5.1 D*, 1996).

Observação de Comportamento

As observações do comportamento desses animais foram realizadas durante todo o período experimental, com especial atenção para sinais de estresse, movimentação no recinto e sinais de cio.

Uma série de observações comportamentais dos animais em diferentes recintos foi feita, com a finalidade de fazer uma análise comparativa da atividade dos animais em relação aos níveis hormonais. Tais observações foram realizadas durante o dia e à noite, com auxílio de visor noturno e de uma filmadora com capacidade para registrar imagens na ausência de luz.

Foram registrados: frequência de utilização de locais para repouso e/ou esconderijo, limpeza corporal, vocalização, horário e duração de movimentação e repouso no recinto.



Períodos Experimentais

Para este estudo, três diferentes períodos experimentais foram adotados.

PRIMEIRO PERÍODO (DE 1/4/98 A 30/6/98)

Durante os primeiros três meses, foram coletadas amostras fecais destas fêmeas alojadas em recintos grandes (Figs. 1 e 2), ambientados com troncos e local para esconderijo (cambiamento).

SEGUNDO PERÍODO (DE 1/7/98 A 31/12/98)

Estas fêmeas foram transferidas para recintos menores e sem ambientação durante seis meses (Fig. 3).

TERCEIRO PERÍODO (DE 01/1/99 A 30/6/99)

Estas fêmeas permaneceram nos mesmos recintos pequenos durante mais seis meses, porém estes foram ambientados com troncos, plantas e caixa para abrigo, proporcionando local para esconderijo. Mesmo protocolo para a colheita de fezes.

PERÍODO DE COLHEITA DE AMOSTRAS E DE OBSERVAÇÃO DE COMPORTAMENTO: 15 meses.

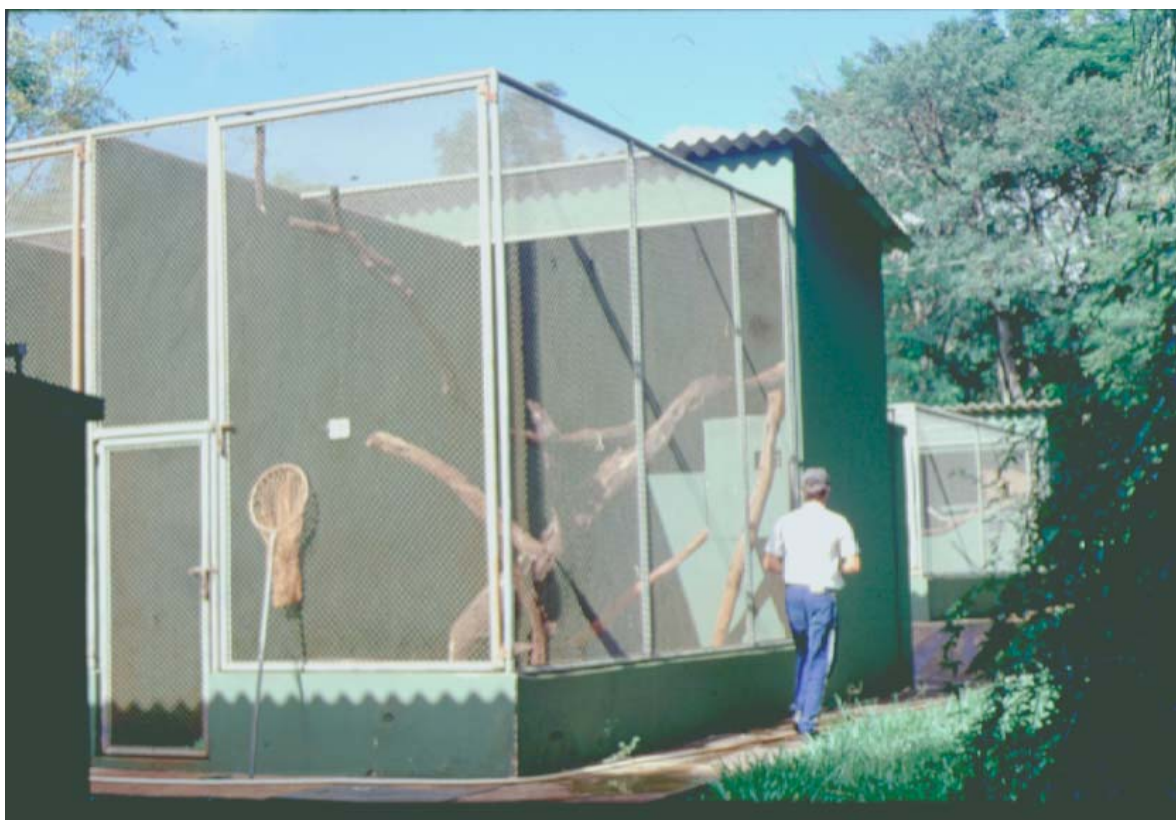


Fig. 1. Recintos utilizados durante a primeira fase do experimento para gato-maracajá (recinto mais alto).



Fig. 2. Recintos utilizados durante a primeira fase do experimento para gato-do-mato-pequeno.



Fig. 3. Recintos utilizados durante a segunda fase do experimento para gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá.

Número de Amostras

O cálculo do número de amostras foi baseado na seguinte fórmula: 20 amostras/mês/fêmea X 15 meses = 300 amostras/fêmea. Como foram 5 fêmeas estudadas, resultou um total de 1500 amostras.

Todas essas amostras foram processadas para dosagens de metabólitos de estrógeno, 900 amostras foram processadas para progestágenos (três amostras/semana/fêmea) e 300 amostras (uma amostra/semana/fêmea) foram processadas para corticóides.

O número total de análises efetuadas foi de, aproximadamente, 2700.



RESULTADOS

O comportamento estereotipado de andar foi mais intenso no período anterior à oferta de alimento. Além disso, os animais de ambas as espécies apresentaram um padrão bimodal de comportamento ativo, com picos de atividade ao anoitecer e ao amanhecer durante todo o experimento. Comportamento agitado, caracterizado por andar estereotipado com alta frequência e duração, foi apresentado por todos os animais durante principalmente os três primeiros dias após a transferência para os recintos menores e sem ambientação.

Não houve grande variação entre indivíduos e espécies com relação ao horário de maior atividade, como também quanto à porcentagem de tempo de comportamento ativo. Com relação aos padrões de comportamento, houve maior frequência de comportamento exploratório e de marcação de território nos recintos ambientados. O padrão de andar estereotipado apresentou maior duração nos recintos menores.

Durante o dia, os animais descansavam nos troncos ou no interior do cambiamento. Em geral, nenhuma fêmea desse estudo mostrou sinais evidentes regulares de receptividade sexual.

Os perfis de metabólitos excretados de estrógeno, progestágeno e cortisol estão apresentados nas figuras de 4 a 8.

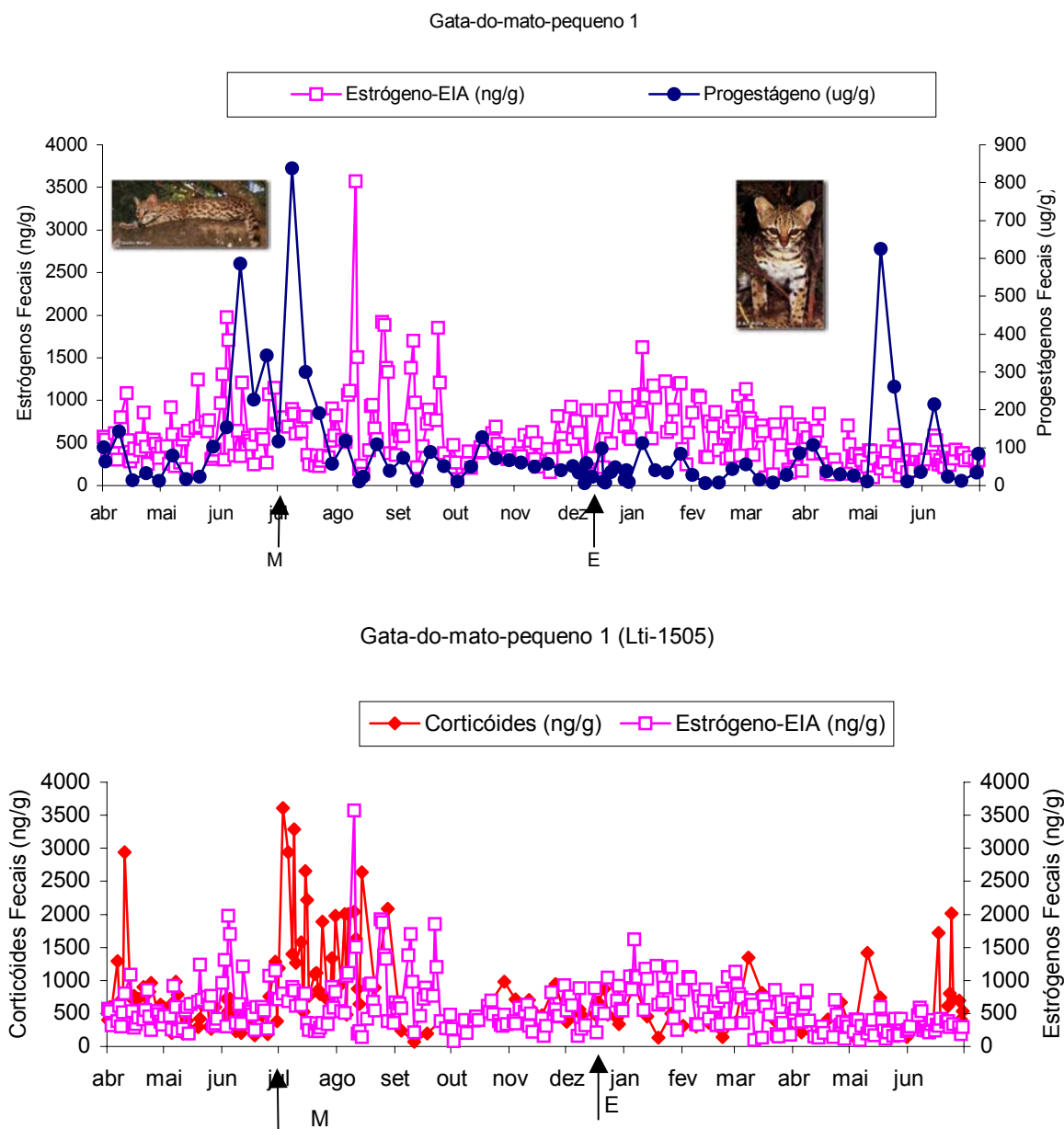


Fig. 4. Perfis da excreção fecal de estrógeno (quadrados vazios), progestágeno (círculos preenchidos) e corticóides (losangos preenchidos) em fêmea adulta de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*). A letra M representa mudança de recinto e a letra E enriquecimento ambiental.

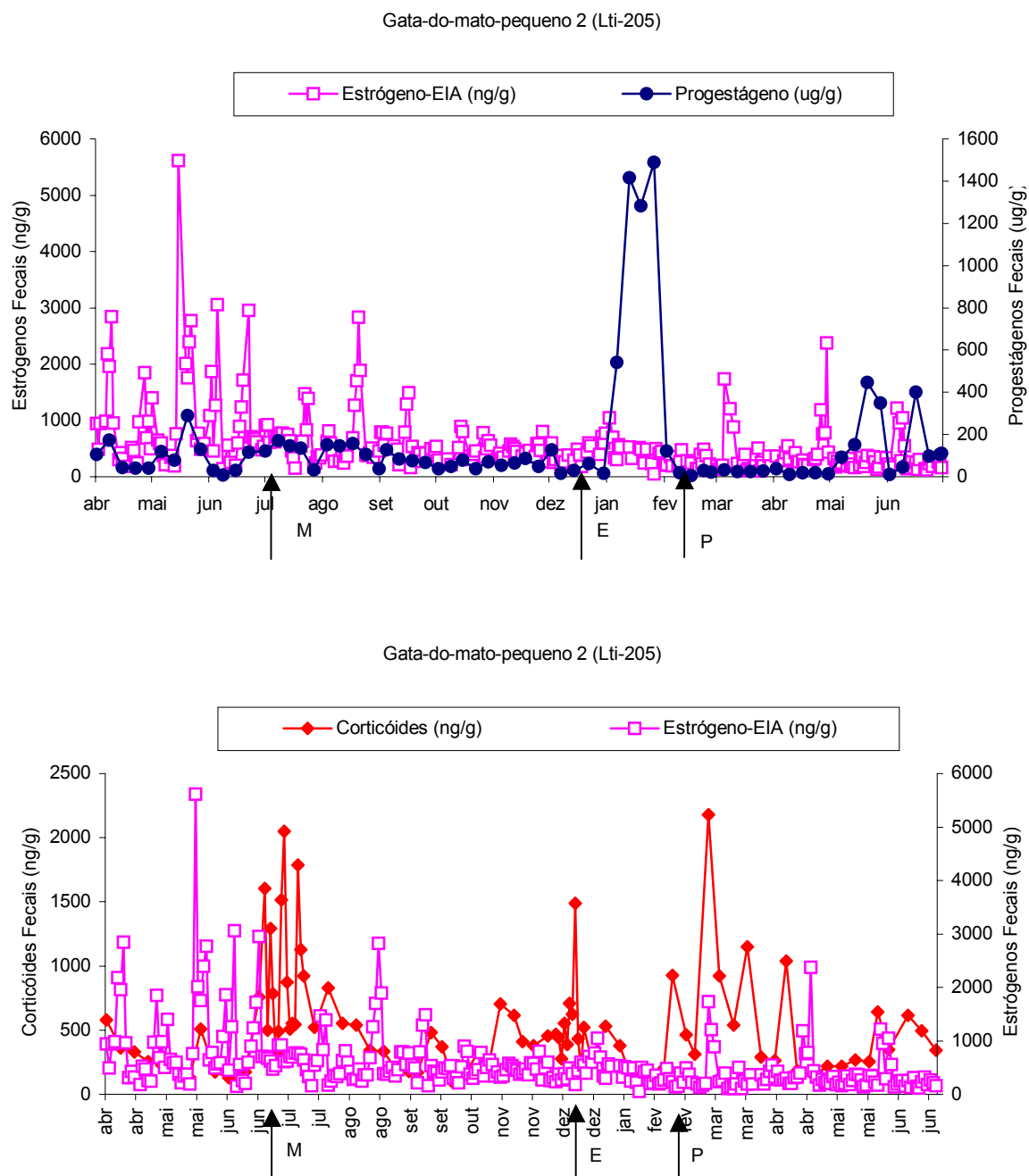


Fig. 5. Perfis da excreção fecal de estrógeno (quadrados vazios), progéstágeno (círculos preenchidos) e corticóides (losangos preenchidos) em fêmea adulta de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*). A letra M representa mudança de recinto, a letra E enriquecimento ambiental e a letra P perda de pelo.

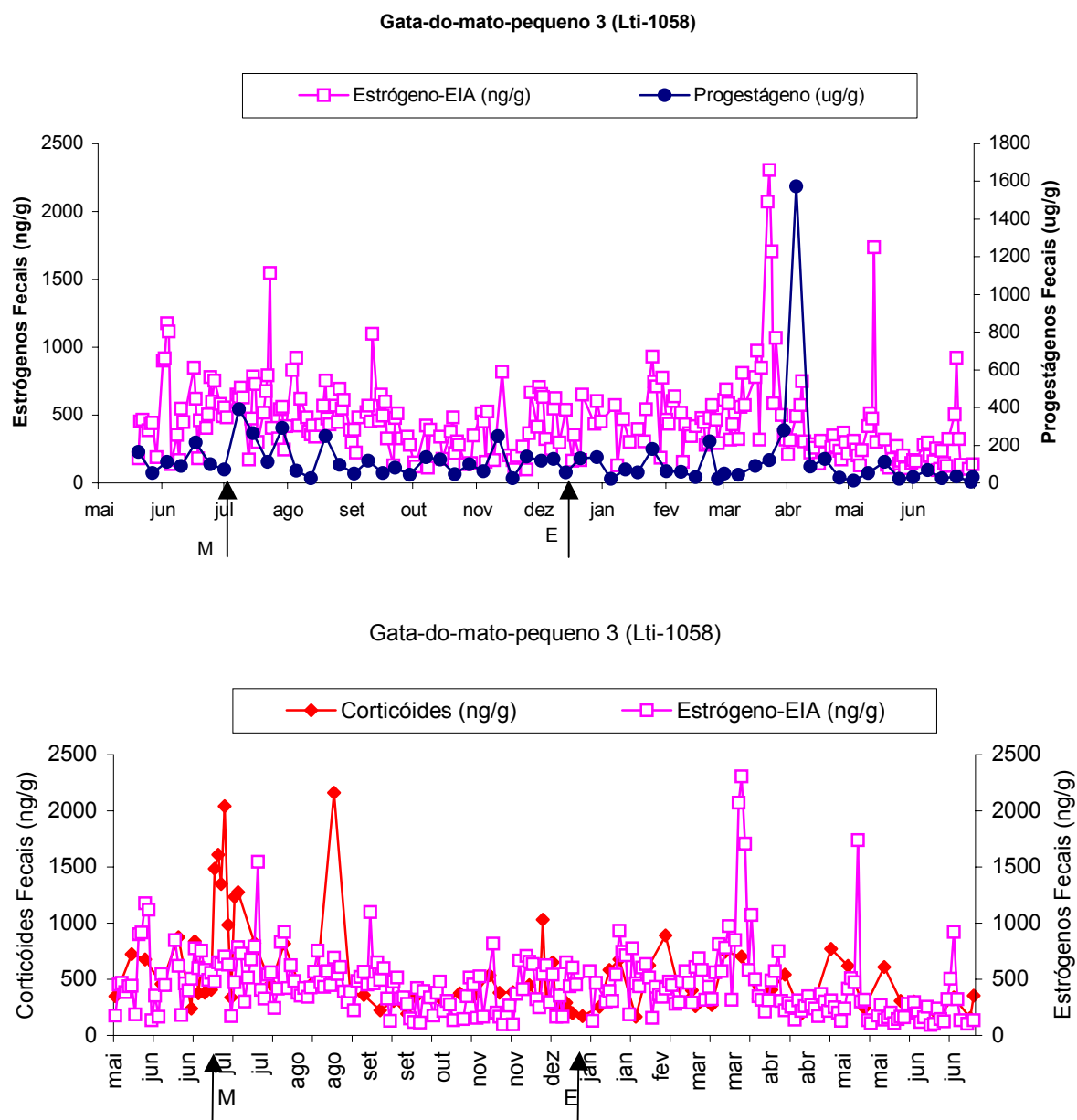


Fig. 6. Perfis da excreção fecal de estrógeno (quadrados vazios), progéstágeno (círculos preenchidos) e corticóides (losangos preenchidos) em fêmea adulta de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*). A letra M representa mudança de recinto e a letra E enriquecimento ambiental.

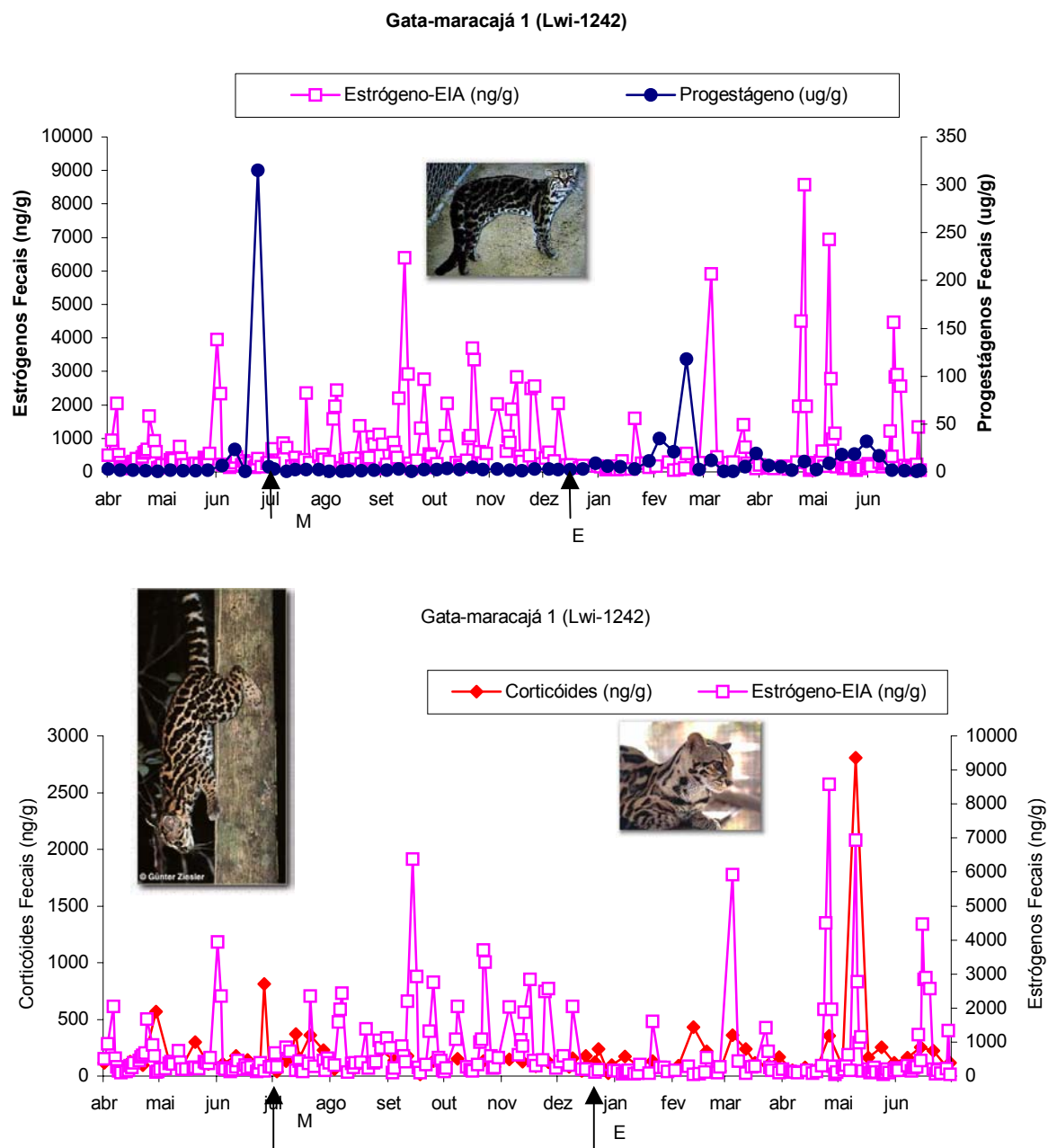


Fig. 7. Perfis da excreção fecal de estrógeno (quadrados vazios), progestágeno (círculos preenchidos) e corticóides (losangos preenchidos) em fêmea adulta de gato-maracajá (*Leopardus wiedii*). A letra M representa mudança de recinto e a letra E enriquecimento ambiental.

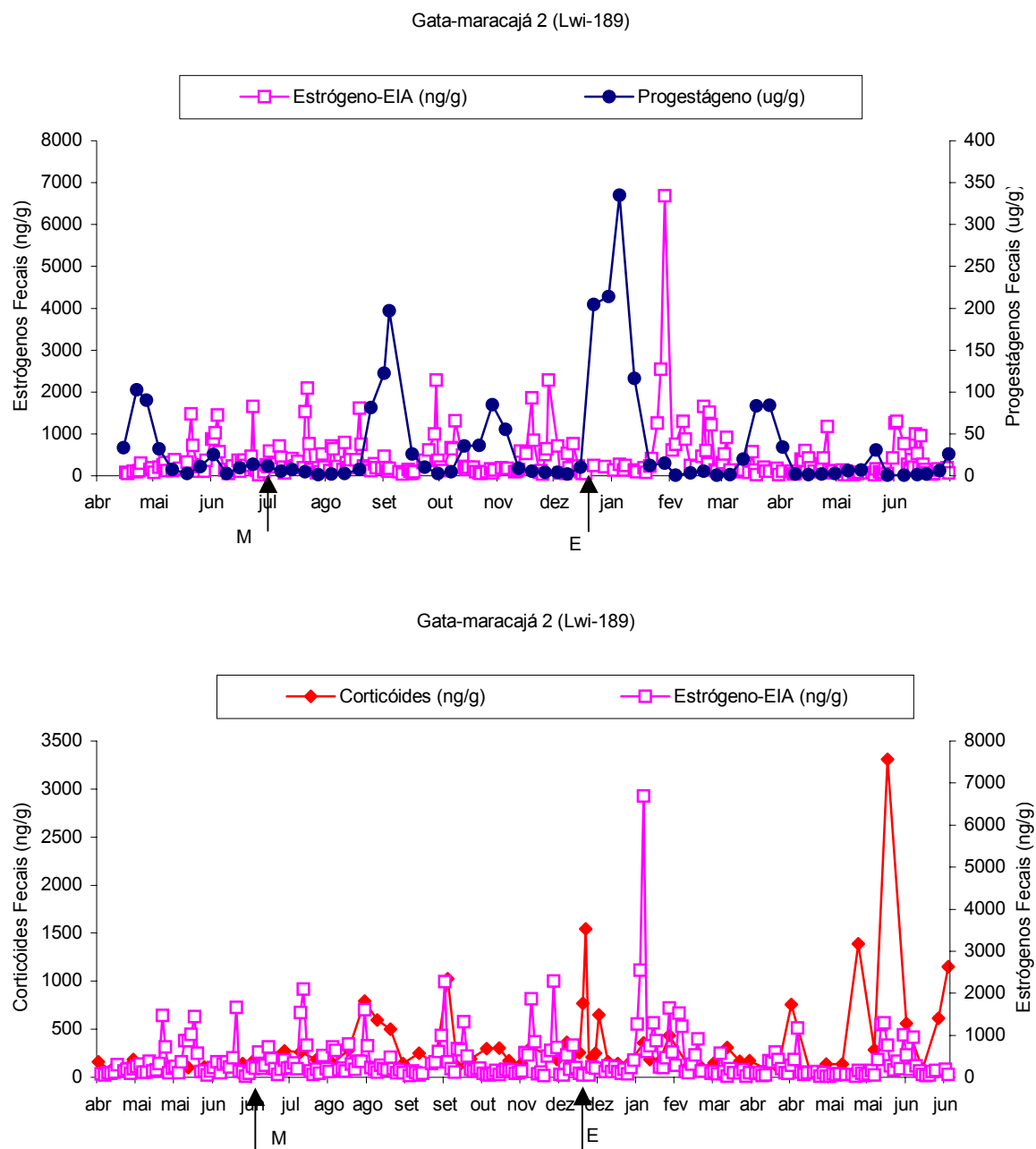


Fig. 8. Perfis da excreção fecal de estrógeno (quadrados vazios), progéstágeno (círculos preenchidos) e corticóides (losangos preenchidos) em fêmea adulta de gato-maracajá (*Leopardus wiedii*). A letra M representa mudança de recinto e a letra E enriquecimento ambiental.

Através das Tabelas 3 e 4, podemos verificar os resultados da análise estatística da comparação entre as fases para as médias de estrógenos e corticóides, por fêmea.

TABELA 3. Concentrações médias (média \pm SEM) de estrógenos fecais, durante as três fases do estudo, para fêmeas de gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá em amostras coletadas durante 15 meses

Fêmea	Estrógenos fecais (ng/g)		
	1 ^a fase	2 ^a fase	3 ^a fase
Gata-do-mato-pequeno 1	605,5 \pm 44,7 ^a	647,3 \pm 49,1 ^a	515,4 \pm 27,6 ^b
Gata-do-mato-pequeno 2	1.018,6 \pm 123,1 ^a	577,5 \pm 38,0 ^b	379,7 \pm 28,0 ^c
Gata-do-mato-pequeno 3	539,2 \pm 53,8 ^a	456,0 \pm 23,3 ^{ab}	430,8 \pm 32,9 ^b
Gata-maracajá 1	497,5 \pm 86,6 ^a	944,3 \pm 118,3 ^b	734,7 \pm 154,5 ^a
Gata-maracajá 2	345,4 \pm 55,8 ^a	406,5 \pm 47,6 ^a	398,7 \pm 74,1 ^a

Letras diferentes mostram pares de médias que são significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) dentro da mesma linha (mesmo indivíduo).

TABELA 4. Concentrações médias (média \pm SEM) de corticóides fecais, durante as três fases do estudo, para fêmeas de gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá em amostras coletadas durante 15 meses

Fêmea	Corticóides fecais (ng/g)		
	1 ^a fase	2 ^a fase	3 ^a fase
Gata-do-mato-pequeno 1	568,4 \pm 49,8 ^a	1.126,8 \pm 120,5 ^b	563,5 \pm 65,9 ^a
Gata-do-mato-pequeno 2	467,9 \pm 98,1 ^a	578,1 \pm 74,8 ^a	515,7 \pm 72,5 ^a
Gata-do-mato-pequeno 3	551,5 \pm 63,6 ^{ab}	698,7 \pm 93,2 ^a	395,8 \pm 35,1 ^b
Gata-maracajá 1	190,9 \pm 48,4 ^a	131,5 \pm 15,1 ^a	230,6 \pm 79,9 ^a
Gata-maracajá 2	111,3 \pm 9,8 ^a	266,5 \pm 33,8 ^b	456,9 \pm 110,8 ^b

Letras diferentes mostram pares de médias que são significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) dentro da mesma linha (mesmo indivíduo).



A fêmea de gato-do-mato-pequeno 1 apresentou menor concentração média de estrógenos fecais apenas durante a 3ª fase e maior concentração média de corticóides fecais durante a 2ª fase. Quando esta fêmea estava no recinto grande e ambientado, apresentou uma ovulação espontânea, seguida de fase luteal com duração aproximada de 41 dias. Esta fêmea apresentou altos valores nas concentrações de corticóides fecais logo após a transferência de recinto e esses altos valores perduraram durante dois meses. Esta fêmea só voltou a ciclar após uma certa diminuição nas concentrações de corticóides fecais, cerca de 40 dias após a transferência de recinto. Depois deste cio, ela apresentou outros três, com intervalos variando de 13 a 15 dias e, posteriormente, não mais ciclou.

A fêmea de gato-do-mato-pequeno 2 apresentou decréscimo gradual das concentrações médias de estrógenos e não houve variação significativa entre as médias das concentrações de corticóides fecais entre as três fases. Pode-se observar (Fig. 5) que essa fêmea vinha ciclando a cada 17-20 dias durante a primeira fase e, com a transferência para o recinto menor e vazio, apresentou altas concentrações de corticosterona e só apresentou cio 51 dias após a transferência. Podem também ser facilmente observados picos de corticosterona coincidindo com a ambientação do recinto (14/dezembro) e com sua contenção e anestesia para exame clínico (3/março), em decorrência de perda de pêlo. Esta fêmea também apresentou uma ovulação espontânea, seguida de fase luteal com duração aproximada de 40 dias, durante a terceira fase do estudo.

A fêmea de gato-do-mato-pequeno 3 apresentou menor concentração média de estrógenos fecais durante a 3ª fase, com diferença significativa ($q_{0,05} = 2,36$; $P < 0,05$) quando comparada com a primeira fase. A maior concentração média de corticosterona foi apresentada durante a segunda fase, diferindo estatisticamente ($q_{0,05} = 2,39$; $P < 0,05$) apenas da terceira fase.

A gata-maracajá 1 continuou ciclando após a transferência para o recinto menor e apresentou uma ovulação espontânea após a ambientação deste. A duração desta fase luteal foi de 28 dias. Não houve diferença significativa entre as fases para as concentrações médias de corticosterona ($q_{0,05} = 2,39$; $P < 0,05$).



A gata-maracajá 2 não apresentou diferença significativa entre as fases para as concentrações médias de estrógenos fecais ($q_{0,05} = 2,36$; $P < 0,05$). Apresentou três ovulações espontâneas no recinto menor, com fases luteais durando de 29 a 37 dias. A primeira fase apresentou a menor concentração média de corticosterona, diferindo estatisticamente das outras duas ($q_{0,05} = 2,39$; $P < 0,05$).

Análises estatísticas para as espécies não foram realizadas devido ao baixo número de animais; entretanto, houve uma variação considerável nas concentrações fecais globais de estrógeno e progestágeno entre e dentro das espécies (Tabela 5 e Figuras 9-12). As concentrações elevadas de progestágenos fecais, quando presentes, foram provavelmente devidas à luteinização de células foliculares ou presença de CLs funcionais como resultado de ovulações espontâneas.

TABELA 5. Média (média \pm SEM) da linha basal e das concentrações pico de estrógenos fecais e metabólitos de progestágeno, por animal, para gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá em amostras coletadas durante 15 meses

Fêmea	Estrógenos fecais		Progestágenos fecais	
	Linha basal	Pico	Linha basal	Pico
	(ng/g)	(ng/g)	(μg/g)	(μg/g)
Gata-do-mato-pequeno 1	342,8 \pm 9,4	1.579,5 \pm 121,7	36,5 \pm 3,1	682,5 \pm 78,4
Gata-do-mato-pequeno 2	353,6 \pm 9,8	2.323,2 \pm 206,6	70,1 \pm 6,3	1.396,4 \pm 60,2
Gata-do-mato-pequeno 3	341,3 \pm 10,5	1.322,0 \pm 124,9	74,6 \pm 6,0	NA
Gata-maracajá 1	263,6 \pm 11,4	4.115,3 \pm 436,7	5,5 \pm 0,9	117,7 \pm 0,0
Gata-maracajá 2	169,5 \pm 7,4	2.035,6 \pm 325,1	10,9 \pm 1,7	237,7 \pm 32,5

NA, não aplicável.

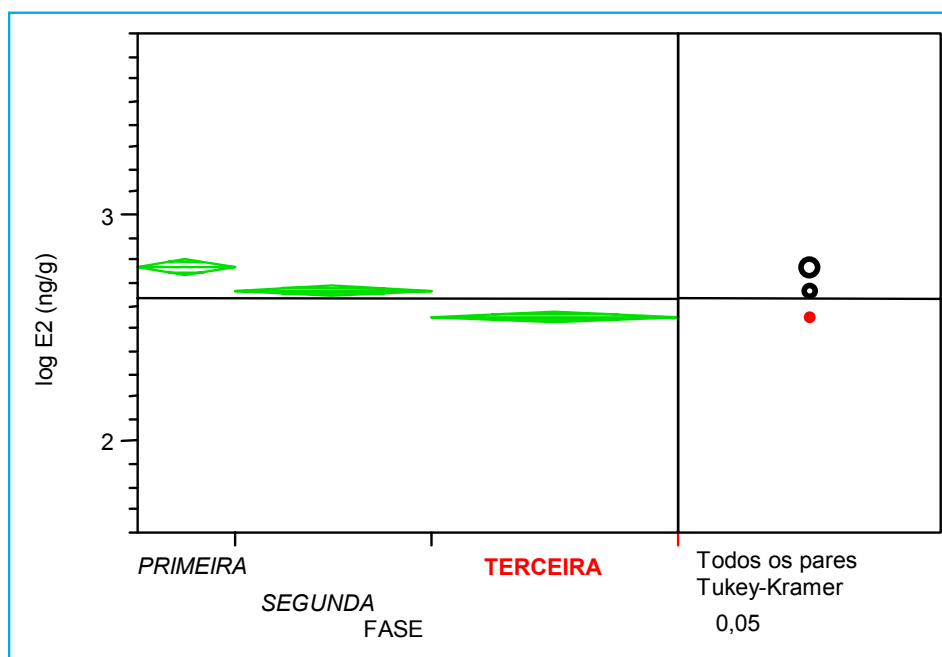


Fig. 9. Gráfico da análise de variância "oneway" de log estrógenos fecais, durante as três fases do estudo, para fêmeas de gato-do-mato-pequeno ($q_{0,05} = 2,35$).

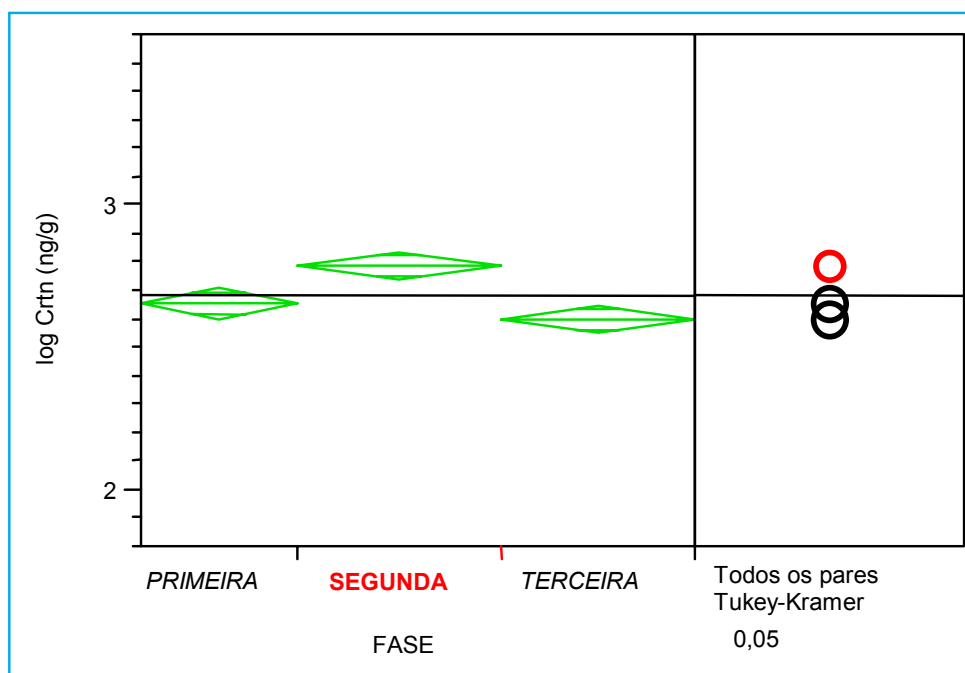


Fig. 10. Gráfico da análise de variância "oneway" de log corticóides fecais, durante as três fases do estudo, para fêmeas de gato-do-mato-pequeno ($q_{0,05} = 2,35$).

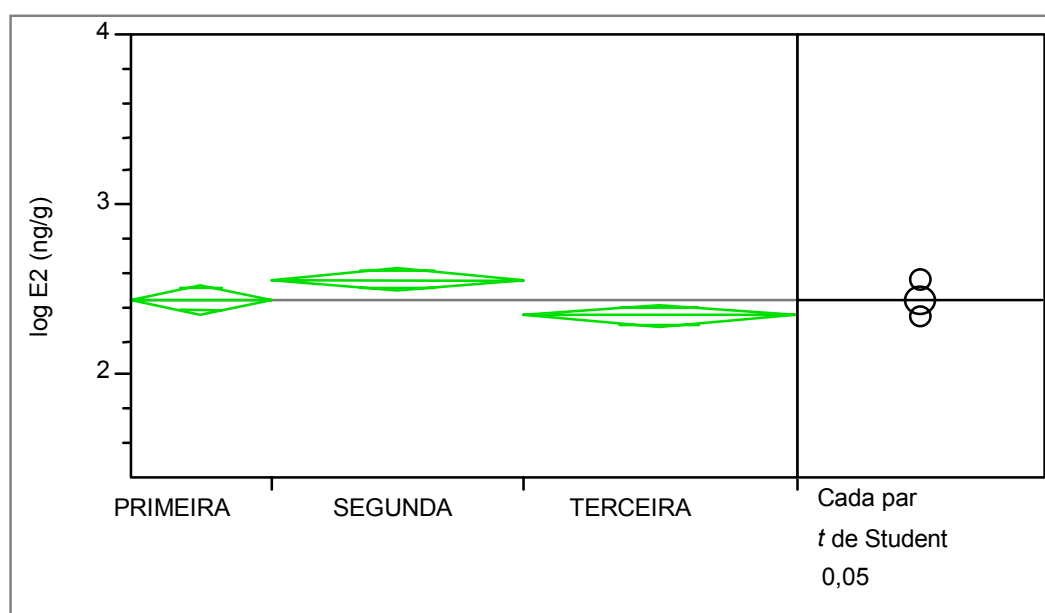


Fig. 11. Gráfico da análise de variância "oneway" de log estrógenos fecais, durante as três fases do estudo, para fêmeas de gato-maracajá ($t_{0,05} = 1,96$).

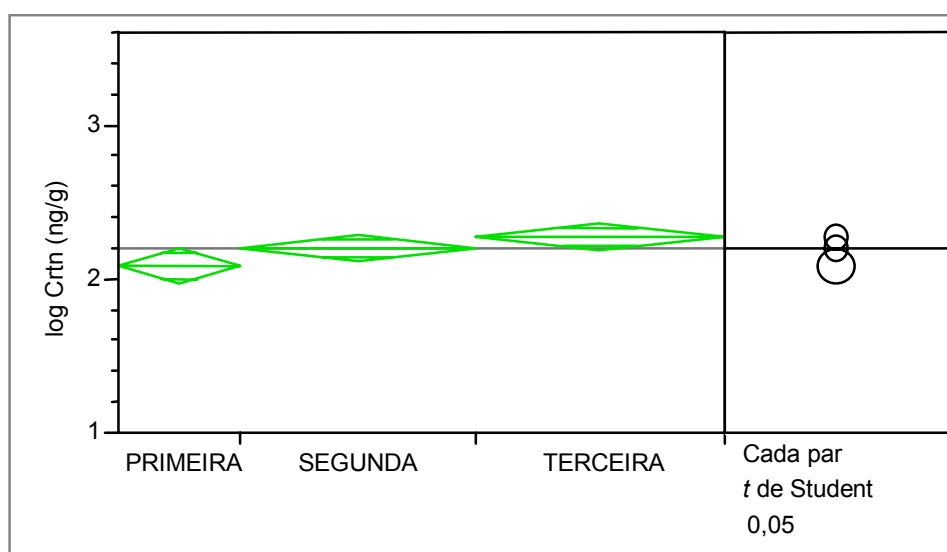


Fig. 12. Gráfico da análise de variância "oneway" de log corticóides fecais, durante as três fases do estudo, para fêmeas de gato-maracajá ($t_{0,05} = 1,97$).



DISCUSSÃO

O padrão bimodal de comportamento ativo apresentado por esses animais cativos assemelha-se ao padrão observado em vida livre através de estudos de campo com jaguatiricas silvestres (Emmons, 1988). Apenas o pico de atividade diurno prévio à alimentação reflete a prática de manejo utilizada e portanto não apresenta contraparte nos animais em vida livre.

O fato dos animais terem apresentado comportamento principalmente noturno, com descanso durante o dia, coincide com o que se tem descrito para o gato-maracajá, tanto na natureza como em cativeiro, com níveis mais altos de atividade registrados entre 01:00-05:00 h (Petersen 1977, Konecny 1989). Em nosso estudo, os períodos dos picos de atividade foram mais próximos das horas diurnas, o que coincide com o observado para jaguatiricas, quando comparados animais de vida livre e em cativeiro (Weller & Bennett, 2001).

Atualmente, “cargas” emocionais são citadas como as razões mais comuns para estresse em humanos (von Holst, 1998) e, como apontado por Ursin e Olff em uma revisão recente (1993), processos emocionais são também os agentes estressantes mais comumente usados em pesquisa animal. É necessário ter em mente, entretanto, que uma ativação do sistema adrenocortical também pode ser induzida sem qualquer estímulo emocional (tal como durante cirurgia sob anestesia profunda ou durante infecção e resultante liberação de mediadores pelo sistema imune). No caso desse experimento, acreditamos que os animais tenham respondido principalmente ao estresse conferido pelo novo, reduzido e desprotegido ambiente. As situações novas, de incerteza ou imprevisíveis são especialmente potentes na indução de um aumento na atividade adrenocortical (Mason, 1968a,b). No caso deste nosso trabalho, nós avaliamos a significância de influências não sociais (condições de recinto) sobre o comportamento e a atividade ovariana.

A reprodução é um sistema fisiológico essencial para a sobrevivência de uma espécie e tem que ocorrer apesar da imposição de estímulos ambientais algumas vezes prejudiciais. O animal que possui várias linhas de defesa, como as exemplificadas anteriormente, pode responder melhor ao meio que o rodeia, através de diferentes níveis de resposta ao estresse, por exemplo, centros nervosos superiores, hipotálamo, hipófise e glândulas adrenais. Cada uma dessas respostas exerce influência nos diferentes níveis da organização reprodutiva, por exemplo, sistema nervoso central, hipotálamo, hipófise e

Nei Moreira

CPGZOO / UFPR



gônadas. Tais métodos diversos de controle asseguram o sucesso de uma espécie e a conservação energética, de tal forma que agentes estressantes menos prejudiciais possam ser manejados em um nível, enquanto circunstâncias mais severas (ou várias situações aditivas) possam requerer respostas em muitos níveis.

A reprodução em cativeiro de espécies ameaçadas é um importante instrumento de conservação. O enriquecimento ambiental pode aumentar o sucesso reprodutivo, diretamente através da provisão de ambientes sociais e físicos necessários para comportamento reprodutivo e cuidado parental bem-sucedidos e, indiretamente, através do fornecimento do ambiente de desenvolvimento requerido para o crescimento de adultos viáveis sob o aspecto reprodutivo (Carlstead & Shepherdson, 1994; Kreger et al., 1998).

A Figura 6 indica que as fêmeas de gato-do-mato-pequeno apresentaram diminuição das concentrações de estrógeno, como consequência da diminuição da atividade ovariana provocada pelo estresse da mudança de um recinto grande e ambientado, para um recinto pequeno e vazio. Foi verificado também que a ambientação do recinto pequeno não foi suficiente para o retorno à atividade ovariana normal. Este estudo descreve também, pela primeira vez, ovulação espontânea em fêmeas de gato-do-mato-pequeno.

Essas mesmas fêmeas de gato-do-mato-pequeno apresentaram elevação das concentrações de cortisol, em decorrência da transferência para um recinto menor e sem ambientação. Como explicação para o decréscimo dos níveis de estrógeno temos que a maioria das situações de estresse, aparentemente, inibe a liberação de GnRH, dessa forma modificando a atividade ovariana e o comportamento sexual hormônio-dependente (Kime et al., 1980; Moberg, 1987; Rabin et al., 1988). Ainda, conforme Collaer & Hines (1995), não se pode descartar a hipótese de que a atividade ovariana nessas fêmeas tenha sido prejudicada pelo aumento das concentrações de andrógenos que ocorre em situações estressantes. Após a ambientação desse pequeno recinto, durante a terceira fase, a concentração média de cortisol retornou aos níveis iniciais, mostrando a importância do fornecimento de esconderijos e troncos, para minimizar o estresse de cativeiro ao qual esses animais foram submetidos.

O aumento da atividade adrenocortical constitui apenas uma parte do padrão de resposta adaptativa e não é suficiente para caracterizar o estado de estresse de um animal, especialmente porque respostas adaptativas a situações estressantes podem ocorrer sem qualquer aumento da atividade adrenocortical (von Holst, 1998). Portanto, a diminuição da concentração média de cortisol, apresentada pelas fêmeas de gato-do-mato-pequeno após a

Nei Moreira

CPGZOO / UFPR



ambientação dos recintos pequenos, pode ter ocorrido apenas como sinal de adaptação, associado à maior privacidade fornecida pela ambientação.

Outros hormônios produzidos pelo córtex da adrenal são os mineralocorticóides, envolvidos no equilíbrio hidroeletrolítico e os esteróides sexuais, particularmente andrógenos, como a dehidroepiandrosterona e a androstenediona. Não se pode descartar a hipótese de que a reprodução na fêmea (incluindo desenvolvimento fetal) possa ser prejudicada pelo aumento das concentrações de andrógenos em situações estressantes (Collaer & Hines, 1995).

O estresse é determinado pela inability de um animal adaptar-se a seu ambiente (Dobson & Smith, 2000). A influência do estresse sobre a reprodução pode ser exemplificada a partir de dados de campo de vacas leiteiras que mostram que fatores estressantes como febre do leite ou laminite aumentam o intervalo do parto à concepção em 13-14 dias e aumentam em 0,5 o número de inseminações por concepção. Sugere-se que uma variedade de pontos regulatórios endócrinos exista enquanto o estresse limita a eficiência reprodutiva. O transporte em ovelhas produz um aumento constante imediato na secreção de arginina vasopressina (AVP) e hormônio liberador de corticotrofina (CRH), mas o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) alcança um máximo na primeira hora enquanto o cortisol é mais alto durante a segunda hora (Dobson & Smith, 2000).

Existem evidências endócrinas que mostram que agentes estressantes interferem com os tempos precisos das liberações de hormônios reprodutivos durante a fase folicular (Dobson & Smith, 2000). Transporte, ou insulina, reduz a frequência e amplitude do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) e pulsos de LH, sugerindo que esses fatores estressantes exerçam efeitos no hipotálamo ou centros superiores no cérebro (Dobson & Smith, 2000). Ambos os agentes estressantes também atrasam o início da onda do hormônio luteinizante (LH). Resultados preliminares sugerem que opióides mediem esses efeitos. Há também evidência que suporta efeitos a nível hipofisário porque o ACTH exógeno, ou transporte, reduzem a quantidade de LH liberada por desafios com o GnRH. A redução na secreção endógena de GnRH/LH ultimamente priva o folículo ovariano de um suporte adequado de gonadotropina levando a uma produção reduzida de estradiol por folículos de crescimento lento. Assim, há um nível de interferência pelos agentes estressantes no ovário (Dobson & Smith, 2000).



A elevação das concentrações de cortisol e a diminuição das concentrações de estrógeno, apresentadas pelas fêmeas de gato-do-mato-pequeno, indicam o estágio de resistência da Síndrome do Estresse (Selye, 1936), em que a atividade gonadal é suprimida por não ser necessária para o enfrentamento do agente estressante.

As fêmeas de gato-maracajá chegaram a apresentar até pequena elevação da média de estrógeno durante a segunda fase, retornando à média inicial durante a terceira fase. Essas fêmeas não apresentaram portanto diminuição da média de estrógeno, apesar dos níveis crescentes de cortisol. Vale a pena lembrar que esses níveis aumentados de cortisol podem elevar a taxa de mortalidade embrionária, conforme já provado para outras espécies de mamíferos.

As fêmeas de gato-do-mato-pequeno apresentaram uma elevação bem evidente nos níveis de cortisol após a transferência dos recintos grandes para os recintos pequenos. Esses altos níveis de cortisol coincidiram com o comportamento agitado que esses animais apresentaram, especialmente nos quatro dias após a transferência de recinto. A principal característica desse comportamento agitado foi a maior frequência de andar estereotipado, em que os animais caminham de um lado para o outro, na frente do recinto, repetindo os mesmos movimentos.

Após a agitação inicial, sobreveio um comportamento caracterizado, principalmente, por imobilidade e sinais indicativos de depressão, característicos do estresse crônico passivo, em que o enfrentamento ativo da situação não é possível e emerge um estado de desamparo (Henry, 1986, 1992). Essa resposta passiva ao estresse é caracterizada pelo aumento da atividade do sistema hipofisário-adrenocortical, enquanto que a atividade do sistema simpático-adrenomedular permanece mais ou menos inalterada.

Analisando-se a fêmea de gato-do-mato-pequeno 1 pode-se observar, facilmente, que após a transferência para o recinto pequeno, ela apresentou altas concentrações de corticóides, acompanhados de uma diminuição da atividade ovariana. Somente após 40 dias da transferência ela voltou à ciclicidade reprodutiva (Fig. 1). Este achado corrobora com os resultados obtidos com rato em laboratório (Schuurman, 1981). A transferência de um animal, que está acostumado com um ambiente específico, para um novo recinto, pode atuar como intenso agente estressante por horas ou mesmo dias, dependendo da espécie.



Todo manuseio de animais (como contenção, transporte ou colheita de sangue) funciona como agente estressante que atua nas variáveis correspondentes durante segundos (catecolaminas), minutos (glicocorticóides, **hormônios gonadais** e tireoidianos) ou por algumas horas (alguns parâmetros imunológicos); portanto caso ocorresse a colheita repetida de amostras de sangue em dias consecutivos, poderia levar a reações extensas de estresse (von Holst, 1998). As concentrações de glicocorticóides aumentam após apenas 3 min do início do procedimento de colheita de sangue, sendo assim “verdadeiros” níveis basais podem, geralmente, ser obtidos apenas sob condições laboratoriais. No caso desse experimento, a colheita de amostras de fezes do chão do recinto dos animais habituados não apresentou essa desvantagem.

Há vários problemas associados com a mensuração dos níveis hormonais. Boa parte dos hormônios não apresenta liberação contínua, mas de forma pulsátil. A amplitude do pulso é geralmente maior no início do período de atividade e menor no final, resultando em uma ritmicidade diurna marcada da concentração hormonal (von Holst, 1998). Devido a essa secreção pulsátil, as concentrações de hormônio no sangue podem aumentar dez ou mais vezes, dentro de minutos. Conseqüentemente, os valores basais podem exibir muita variação intra e interindividual, mesmo que muito cuidado seja tomado para que os fatores potencialmente interferentes sejam excluídos. Isso impede a interpretação a nível individual da maioria dos parâmetros endócrinos com base em amostras de sangue únicas. Embora seja possível obter amostras sanguíneas de grandes animais durante várias horas e até por alguns dias, através da inserção de cânulas nos vasos sanguíneos, esse método é geralmente estressante para os animais, inibe a liberdade de movimento e, portanto, é de aplicação limitada a experimentos de laboratório (Fagin et al., 1983; Schuurman, 1981). Nesse caso, a colheita diária de amostras fecais permitiu a avaliação da concentração hormonal de esteróides referente ao dia anterior, representando dessa forma um “pool” hormonal das 24 h anteriores.

Além disso, muitos parâmetros fisiológicos podem apresentar ritmos anuais ou outras periodicidades, que podem influenciar os valores hormonais. Os resultados apresentados no Capítulo 2, mostraram a não ocorrência de sazonalidade com relação aos hormônios esteróides ovarianos, validando dessa forma os resultados aqui obtidos.

As diferenças individuais na resposta ao estresse podem ser explicadas pela afirmação de von Holst (1998), em que os gatilhos das reações de estresse são principalmente

Nei Moreira

CPGZOO / UFPR



processos psíquicos resultantes da avaliação de uma situação por um indivíduo. Dependendo do seu comportamento de enfrentamento, esses processos levam a padrões de respostas fisiológicas diferentes, que podem resultar em vários efeitos patofisiológicos. Uma determinada situação ou estímulo pode variar no seu efeito de um indivíduo para outro, atuando como um agente estressante extremamente danoso, uma influência inofensiva ou mesmo como estímulo positivo.

O aumento dos níveis séricos ou das taxas de excreção dos glicocorticóides, tais como cortisol e/ou corticosterona, ou outras indicações de atividade adrenocortical aumentada têm sido usados como um índice de adaptação de um organismo a uma situação estressante ou para avaliar a intensidade de um agente estressante. Concordando com von Holst (1998), embora esse método possa parecer atrativo metodologicamente, é importante não associar o estresse apenas com a função adrenocortical, já que as respostas de um organismo a novas e súbitas demandas compreendem quase todos os sistemas fisiológicos.

Apesar das medidas de largura e altura dos recintos pequenos utilizados serem um pouco inferiores ao tamanho mínimo recomendado pela Associação Americana de Zoológicos e Aquários (AZA), o comprimento era maior e, mesmo assim, foram verificados efeitos adversos dessas dimensões de recintos e inicial falta de ambientação sobre a atividade ovariana dessas fêmeas. Além disso, o volume dos recintos pequenos ($11,04 \text{ m}^3$) enquadra-se nos requisitos propostos pela Instrução Normativa 001/89-P do IBAMA, de 19 de outubro de 1989, que estabelece um volume do alojamento em que o(s) animal(is) está exposto à observação do público de 10 a 30 m^3 , para até dois indivíduos adultos. Considerando esses resultados, verifica-se a importância das dimensões e ambientação dos recintos.

A ambientação deve ser feita com troncos de árvores, que permitam aos felídeos, de maneira naturalística, utilizar os componentes verticais do recinto, além de utilizá-los para afiar as unhas. Cada recinto deveria incluir ao menos uma barreira visual para que o animal possa esconder-se. Plataformas altas, com locais de esconderijo, fornecem ao mesmo tempo proteção e controle visual dos arredores. O fornecimento de gramíneas mostrou-se como de pronta utilização pelos animais, correspondendo a mais uma forma de estimular hábitos naturais de comportamento.

Condições de cativeiro não apenas influenciam o comportamento dos animais, mas também estão associadas a marcantes alterações fisiológicas, que podem influenciar a fertilidade de forma positiva ou negativa, dependendo do tipo de interação. Estes

Nei Moreira

CPGZOO / UFPR



resultados fornecem subsídios para a melhoria do manejo e reprodução em cativeiro de nossas espécies de felídeos ameaçadas de extinção.

CONCLUSÕES

1. A transferência de recintos grandes e ambientados para recintos pequenos e sem ambientação induziu estresse, observado através do comportamento em ambas as espécies e do aumento das concentrações de corticóides fecais em gato-do-mato-pequeno.
2. Os episódios de aumento da atividade adrenocortical foram acompanhados da diminuição da atividade ovariana nas fêmeas de gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá.
3. Foram observadas ovulações espontâneas em fêmeas de gato-do-mato-pequeno, sugerindo que estas podem ocorrer raramente nessa espécie.
4. Fêmeas de gato-maracajá podem apresentar atividade luteal não induzida por coito com certa frequência.



REFERÊNCIAS

1. Beato, M., Doenecke, D. (1980) Metabolic effects and modes of action of glucocorticoids. In: I. Chester Jones & I.W. Henderson, (eds.). *General, Comparative and Clinical Endocrinology of the Adrenal Cortex*, 117-181. London: Academic Press.
2. Beltran, J., Delibes, M., (1994) Environmental determinants of circadian activity of free-ranging Iberian lynxes. *J. Mammal.* 75, 382-393.
3. Berkson, G. (1967) Abnormal stereotyped motor acts. In: Zubin J. & Hunt H.F. (eds.). *Comparative Psychopathology: Animal and Human*, 76-94. New York: Grune & Stratton.
4. Blanchard, D.C., Sakai, R.R., McEwen, B., Weiss, S.M., Blanchard, R.J. (1993) Subordination stress: Behavioral, brain and neuroendocrine correlates. *Behav. Brain Res.* 58:113-121.
5. Bradley, A.J., McDonald, I.R., Lee, A.K. (1980) Stress and mortality in a small marsupial (*Antechinus stuartii*, Macleay). *Gen. Comp. Endocrinol.* 40-188-200.
6. Broom, D.M. (1983) Stereotypies as animal welfare indicators. In *Indicators Relevant to Farm Animal Welfare*, ed. D. Schmidt, 8-87. The Hague: Martinus Nijhoff.
7. Brown, J.L., Wasser, S.K., Wildt, D.E., Graham, L.H. (1994) Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. *Biol. Reprod.* 51:776-786.
8. Carlstead, K., Brown, J.L., Seidensticker J. (1993) Behavioral and adrenocortical responses to environmental changes in leopard cats (*Felis bengalensis*). *Zoo Biology* 12:321-331.
9. Carlstead, K., Shepherdson, D. J. (1994) Effects of environmental enrichment on reproduction. *Zoo Biology* 13:447-458.
10. Carlstead, K. (1998) Determining the causes of stereotypic behaviors in zoo carnivores - Toward appropriate enrichment strategies. In *Second Nature - Environmental Enrichment for Captive Animals*, ed. D. J. Shepherdson, J.D. Mellen, & M. Hutchins, 172-183. Washington: Smithsonian Institution.
11. Collaer, M.L., Hines, M. (1995) Human behavioral sex differences: A role for gonadal differences during early development. *Psychol. Bull.* 118:55-107.
12. De Jonge, G., Carlstead, K., Wiepkema, P.R. (1986) *The Welfare of Ranch Mink*. COVP Issue 08. Beekbergen, The Netherlands: Het Spelderholt.



13. Dobson, H., Campbell, B.K., Scaramuzzi, R.J., Baird, D.T. (1999a) Effect of reducing LH pulse frequency and amplitude on ovarian oestradiol production in the ewe. In: 5th International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants. J. Reprod. Fertil., Suppl. 54.
14. Dobson, H., Smith, R. F. (2000) What is stress, and how does it affect reproduction? Animal Reproduction Science 60-61:743-752.
15. Dobson, H., Tebble, J.E., Ozturk, M., Smith, R.F. (1999b) J. Reprod. Fertil.
16. Dobson, H., Tebble, J.E., Phogat, J.B., Smith, R.F. (1999c) Effect of transport on pulsatile and surge secretion of LH in ewes in the breeding season. J. Reprod. Fertil. 116:1-8.
17. Emmons, L.H. (1988) A field study of ocelots (*Felis pardalis*) in Peru. Rev. Ecol. (Terre Vie) 43:133-157.
18. Evans, N.P., Dahl, G.E., Mauger, D., Karsch, F.J. (1995) Estradiol induces both qualitative and quantitative changes in the pattern of gonadotropin-releasing hormone secretion during the presurge period in the ewe. Endocrinology 136:1603-1609.
19. Fagen, R.M., Wiley, K.S. (1978) Felid paedomorphosis, with special reference to *Leopardus*. Carnivore 1:72-81.
20. Fagin, K.D., Shinsako, J., Dallman, M.F. (1983) Effects of housing and chronic cannulation on plasma ACTH and corticosterone in the rat. Am. J. Physiol. 245:E515-E520.
21. Gardner, A.L. (1971) Notes on the little spotted cat, *Felis tigrina oncilla* Thomas, in Costa Rica. J. Mammal. 52(2):464-465.
22. Hancocks, D. (1980) Bringing nature into the zoo: Inexpensive solutions for zoo environments. International Journal for the Study of Animal Problems 1:170-177.
23. Hediger, H. (1950) *Wild Animals in Captivity: An Outline of the Biology of Zoological Gardens*. New York: Dover.
24. Henry, J.P. (1986) Neuroendocrine patterns of emotional response. In *Emotion: Theory, Research and Experience* (R. Plutchik, ed.), New York: Academic Press. Vol. 3, pp. 37-60.
25. Henry, J.P. (1992) Biological basis of the stress response. Integr. Physiol. Behav. Sci. 27:66-83.
26. Holzapfel, M. (1938) Über Bewegungstereotypien bei gehaltenen Säugetieren. I. Mitt. Bewegungstereotypien bei Caniden und Hyaena. Zeitschrift für Tierpsychologie 2:46-72.

27. Hutchins, M., Hancocks, D., Crockett, C. (1984) Naturalistic solutions to the behavioral problems of captive animals. *Zoologische Garten* 54:28-42.
28. Kass, E.M., Hechter, O., Macci, I.A., Mou, T.H. (1954) Changes in pattern of secretion in rabbits after prolonged treatment with ACTH. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 85:583-587.
29. Kime, D.E., Vinson, G.P., Major, P.W., Kilpatrick, R. (1980) Adrenal-gonad relationships. In *General, Comparative and Clinical Endocrinology of the Adrenal Cortex* (I. Chester Jones & I.W. Henderson, eds.). London, Academic Press. Pp. 183-264.
30. Kleiman, D. (1994) Animal behavior studies and zoo propagation programs. *Zoo Biol.* 13, 411-412.
31. Konecny, M.J. (1989) Movement patterns and food habits of four sympatric carnivore species in Belize, Central America. In *Advances in neotropical mammalogy* (K.H. Redford and J.F. Eisenberg, eds.). Sandhill Crane Press, Gainesville. Pp 243-264.
32. Kreger, M. D., Hutchins, M., Fascione, N. (1998) Context, ethics, and environmental enrichment in zoos and aquariums. In *Second Nature - Environmental Enrichment for Captive Animals* (Shepherdson, D. J., Mellen, J. D. & Hutchins, M., eds.). Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press. pp. 59-82.
33. Krum, A.A., Glenn, R.E. (1965) Adrenal steroid secretion in rabbits following prolonged ACTH administration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 118:225-258.
34. Lay, D.C., Randel, R.D., Friend, T.H., Carrol, J.A., Welsh, T.H., Jenkins, O.C., Neuendorff, D.A., Bushong, D.M. (1997) Effects of prenatal stress on the fetal calf. *Domest. Anim. Endocrinol.* 14:73-80.
35. Law, G., MacDonald, A., Reid, A. (1997) Dispelling some common misconceptions about the keeping of felids in captivity. *Int. Zoo Yearb.* 35, 197-207.
36. Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D. (1997) Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277:1659-1662.
37. Magarinos, A.M., McEwen, B.S., Flügge, G., Fuchs, E. (1996) Chronic psychosocial stress causes apical dendrite atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J. Neurosci.* 16:3534-3540.
38. Mason, G.J. (1991a) Stereotypies: A critical review. *Animal Behaviour* 41:1015-1037.
39. Mason, G.J. (1991b) Stereotypies and suffering. *Behavioural Processes* 25:103-115.



40. Mason, J.W. (1968a) Organization of psychoendocrine mechanisms. *Psychosom. Med.* 30:565-808.
41. Mason, J.W. (1968b) "Over-all" hormonal balance as a key to endocrine organization. *Psychosom. Med.* 30:791-808.
42. McNeilly, A.S., Picton, H.M., Campbell, B.K., Baird, D.T. (1991) Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. *J. Reprod. Fertil.* 92:177-186.
43. Mellen, J.D. (1989) Reproductive behavior of small captive exotic cats (*Felis* spp.). Ph.D. Dissertation, University of California, Davis. 161 p.
44. Mihm, M., Baguisi, A., Boland, M.P., Roche, J.F. (1994) Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *J. Reprod. Fertil.* 102:123-130.
45. Moberg, G.P. (1987) Influence of the adrenal axis upon the gonads. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* 9:456-496.
46. Moenter, S.M., Caraty, A., Karsch, F.J. (1990) The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology* 127:1375-1384.
47. Mondolfi, E. (1986) Notes on the biology and status of the small wild cats in Venezuela. In *Cats of the world: biology, conservation and management* (S.D. Miller and D.D. Everett, eds.) National Wildlife Federation, Washington D.C. Pp 125-146.
48. Moor, R.M., Smith, M.W., Dawson, R.M.C. (1980) Measurement of intercellular coupling between oocytes and cumulus cells using intracellular markers. *Exp. Cell Res.* 126:15-29.
49. Morris, D. (1962) Occupational therapy for captive animals. In *The Environment of Laboratory Animals*, vol. 2, 7-42. Carshalton, U.K.: MRC Laboratories.
50. Munck, A., Guyre, P.M., Holbrook, N.J. (1984) Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.* 5:25-45.
51. Odberg, F. (1978) Abnormal behaviours (stereotypies). In: Garsi J. (Ed.). *Proceedings of the First World Congress on Ethology Applied to Zootechnics*, Madrid: Industrias Graficas.
52. Ottenweller, J.E., Tapp, W.N., Burke, J.M., Natelson, B.H. (1985) Plasma cortisol and corticosterone concentrations in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Life Sci.* 37:1551-1558.
53. Pantiff, J.A., Anderson, D.E. (1980) Breeding the margay at New Orleans Zoo. *Int Zoo Yearb* 20:223-224.



54. Petersen, M.K. 1977. Courtship and mating patterns of margays. Pp 22-35 in R.L. Eaton, ed. *The world's cats 3(3): biology, behavior and management of reproduction*. Carnivore Res. Inst., Univ. Washington, Seattle.
55. Phogat, J.B., Smith, R.F., Dobson, H. (1999) Effect of transport on pituitary responsiveness to exogenous pulsatile GnRH and oestradiol-induced LH release in intact ewes. *J. Reprod. Fertil.* 116:9-18.
56. Rabin, D., Gold, P.W., Margioris, A.N., Chrousos, G.P. (1988) Stress and reproduction: Physiologic and pathophysiologic interactions between the stress and the reproductive axes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 245:377-387.
57. Ridley, R.M. & Baker, H.F. (1982) Stereotypy in monkeys and humans. *Psychological Medicine* 12:61-72.
58. Romeyer, A. & Bouissou, M.F. (1992) Assessment of fear reactions in domestic sheep, and influence of breed and rearing conditions. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 34:1-2.
59. Schouten, W., Rushen, J., Passille, A.M. (1991) Stereotypic behavior and heart rate in pigs. *Physiology and Behavior* 50:617-624.
60. Schuurman, T. (1981) Endocrine processes underlying victory and defeat in the male rat. Tese de Doutorado, Rijksuniversiteit, Groningen, Netherland.
61. Selye, H. (1936) A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138:32-34.
62. Selye, H. (1950) *Stress*. Acta, Montreal.
63. Selye, H. (1952) *The Story of the Adaptation Syndrome*. Acta, Montreal.
64. Selye, H. (1976) *Stress in Health and Disease*. Butterworth, Boston.
65. Selye, H. (1981) The stress concept today. In "Handbook on Stress and Anxiety. Contemporary Knowledge, Theory, and Treatment" (I.L. Kutash and L.B. Schlesinger, eds.). Pp. 127-143. Jossey-Bass, San Francisco.
66. Shepherdson, D.J. (1998) Tracing the path of environmental enrichment in zoos. In *Second Nature - Environmental Enrichment for Captive Animals* (Shepherdson, D. J., Mellen, J. D. & Hutchins, M., eds.). Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press. pp. 1-12.
67. Staigmiller, R.B., Moor, R.M. (1984) Effect off follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Res.* 9:221-229.



68. Stevens, E., Hutchins, M. (1993) In: Proceedings of AAZPA Omaha Annual Conference on the Applying Behavioral Research to Zoo Animal Management Workshop: An Update, 12-16 September, pp. 41-45.
69. Sunquist, M.E., Sunquist, F., D.E. Daneke (1989) Ecological separation in a Venezuelan llanos carnivore community. In *Advances in neotropical mammalogy* (K.H. Redford and J.F. Eisenberg, eds.) Gainesville: Sandhill Crane Press. Pp 197-232.
70. Ursin, H., Olff, M. (1993) The stress response. In *Stress. From the Synapse to the Syndrome* (S.C. Stanford & P. Salmon, eds.). London: Academic Press. Pp. 3-22.
71. von Holst, D.V. (1998) Stress and its relevance for animal behavior. In *Stress and Behavior* (a volume in *Advances in the Study of Behavior*; eds. P.J.B. Slater, J.S. Rosenblatt, C.T. Snowdon, M. Milinski), eds. P.J.B. Slater, J.S. Rosenblatt, C.T. Snowdon & M. Milinski, San Diego: Academic Press. Vol. 27, pp. 1-131.
40. Wasser S.K., Monfort S.L., Wildt D.E. (1991) Rapid extraction of faecal steroids for measuring reproductive cyclicity and early pregnancy in free-ranging yellow baboons (*Papio cynocephalus cynocephalus*). *J. Reprod. Fert.* 92:415-423.
72. Wasser S.K., Thomas R., Nair P.P., Guidry C., Southerns J., Lucas J., Wildt D.E., Monfort S.L. (1993) Effects of dietary fibre on faecal steroid measurements in baboons (*Papio cynocephalus cynocephalus*) *J. Reprod. Fert.* 97:569-574.
73. Weller, S.H., Bennett, C.L. (2001) Twenty-four hour activity budgets and patterns of behavior in captive ocelots (*Leopardus pardalis*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 71(1):67-79.
74. Wiepkema, P.R. (1983) On the significance of ethological criteria for the assessment of animal welfare. In *Indicators Relevant to Farm Animal Welfare*, ed. D. Schmidt, 71-79. The Hague: Martinus Nijhoff.



5. Progestágenos, estrógenos e corticóides fecais durante a gestação, o parto e o pós-parto em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e gato-maracajá (*Leopardus wiedii*)

RESUMO

As concentrações de progestágenos, estrógeno e corticóides foram medidas em amostras fecais durante a gestação, o parto e o pós-parto em uma fêmea de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e uma fêmea de gato-maracajá (*Leopardus wiedii*). Os perfis hormonais da fêmea de gato-do-mato-pequeno foram acompanhados durante 4 meses e 11 dias, com início 46 dias antes do parto. Os perfis hormonais da fêmea de gato-maracajá foram acompanhados durante 6 meses e 13 dias, com início 10 dias antes do parto. O radioimunoensaio (RIA) foi utilizado para progestágenos e corticóides, enquanto o enzimoimunoensaio (EIA) foi utilizado para estrógeno. Em gato-do-mato-pequeno foi bem nítido o aumento das concentrações de corticosterona próximo ao momento do parto, seguido de posterior declínio. Analisando-se o progestágeno, este apresentou uma linha de tendência linear decrescente, do final da gestação para o início do pós-parto. Com relação aos metabólitos fecais de estrógeno, não houve variação evidente durante o período considerado. Na fêmea de gato-maracajá, também foi bem nítido o aumento das concentrações de corticosterona próximo ao parto, bem como próximo à separação do filhote, indicando situações de estresse ao qual a fêmea foi submetida. Após a retirada do filhote, foi bem nítida a retomada da atividade folicular ovariana, com picos sucessivos de estrógeno, que refletem períodos de estro intercalados com períodos de interestro. O fato dessa fêmea voltar a ciclar após a remoção do filhote, deve-se provavelmente ao decréscimo do efeito inibidor da prolactina sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário. Os níveis de progestágenos, como era esperado, decresceram após o parto e permaneceram basais. Os perfis hormonais apresentados durante gestação, parto e pós-parto nessas duas espécies assemelham-se muito em linhas gerais aos de outros felídeos, sugerindo que esses mecanismos sejam conservados dentro do táxon, apesar de que a taxa de excreção de esteróides seja mais espécie-específica.

Palavras-chave: progestágenos; estrógenos; corticóides fecais; gestação; esteróides fecais; monitorização não invasiva; reprodução



ABSTRACT

Progestagens, estrogen and corticoids concentrations were measured in fecal samples during gestation, parturition and lactation in one tigrina (*Leopardus tigrinus*) female and in one margay (*Leopardus wiedii*) female. The tigrina female hormonal profiles were followed during 4 months and 11 days, beginning 46 days before parturition. The margay female hormonal profiles were followed during 6 months and 13 days, beginning 10 days before parturition. Radioimmunoassay (RIA) was used for progestagens and corticoids, while enzymeimmunoassay (EIA) was used for estrogen. In tigrina it was well noticed the increase in corticosterone concentrations near parturition, followed by a decline. Analyzing progestagen, this showed a decreasing tendency line, from the end of gestation until the beginning of lactation. In relation to the estrogen fecal metabolites, there was no evident variation during the considered period. In the margay female, it was also well noticed the increasing in the corticosterone concentrations near parturition, as well near the cub separation, indicating stress situations in which the female was submitted. After cub removal, it was well noticed the beginning of ovarian follicular activity, with succeeding estrogen peaks, that reflect estrous periods interpolated with interestrous periods. The fact that this female returned to cycle after cub removal must be probably to the decrease in the prolactin inhibitor effect over hypothalamic-hypophyseal axis. Progestagens levels, as it was waited, decreased after parturition and stayed at basal levels. Hormonal profiles presented during gestation, parturition and lactation in these two species resemble a lot, in general lines the other felids, suggesting that these mechanisms are conserved in the taxon, in spite of the steroids excretion rate be more species-specific.

Key words: progestogens; estrogens; fecal corticoids; gestation; fecal steroids; non-invasive monitoring; reproduction



INTRODUÇÃO

Os hormônios gonadais (progestágenos e estrógeno) e os corticóides são compostos lipídicos conhecidos como esteróides. Sua síntese, a partir da acetil-CoA ao colesterol, ocorre no retículo endoplasmático liso. O colesterol é transportado para a mitocôndria e a cadeia lateral é clivada para originar a pregnenolona. A pregnenolona é convertida a progesterona no retículo endoplasmático (Greco & Stabenfeldt, 1999).

No caso dos hormônios gonadais, a hidroxilação e descarboxilação da progesterona, que leva à formação de andrógeno, ocorre no citoplasma (Greco & Stabenfeldt, 1999). Os estrógenos são derivados dos andrógenos através da eliminação do grupo metil do C₁₉ e aromatização do anel A. O LH estimula as células da teca dos folículos a secretar testosterona (T). A testosterona é subsequenteiramente aromatizada a estradiol nas células da granulosa sob a influência da estimulação do FSH (Greco & Stabenfeldt, 1999).

Como progestágenos ovarianos temos a progesterona, a 17 α -OH-progesterona, a 20 α -OH-progesterona e a 20 β -OH-progesterona. Como estrógenos ovarianos temos o estradiol-17 β , a estrona, o 6 α -OH- estradiol-17 β , o estradiol-17 α e o 16 α -estriol (Greco & Stabenfeldt, 1999).

Através da endocrinologia não invasiva (Capítulo 2) é possível monitorar a função reprodutiva feminina, determinar o período adequado para introduções co-específicas ou para inseminação artificial, além do diagnóstico de gestação. O uso dessa tecnologia, tanto em análises retroativas como em tempo real, pode melhorar os resultados de reprodução assistida e natural (Capítulo 2).

Para muitas outras espécies de mamíferos, a condição reprodutiva tem sido determinada através da monitorização da excreção de metabólitos de esteróides ovarianos (progestágenos e estrógenos) nas fezes (Schwarzenberger et al., 1996), permitindo inclusive o acompanhamento pós-parto.

Define-se período pós-parto como o período de tempo entre o parto e o primeiro cio após o desmame. Esta fase é caracterizada e influenciada pela lactação, que tem como um dos efeitos a supressão da atividade ovárica. Durante esse período ocorre involução uterina e a atividade folicular vai incrementando lentamente. A partir do desmame, sem o efeito inibitório da sucção e com concentrações plasmáticas de prolactina cada vez mais



baixas, o crescimento folicular acelera-se, provocando o aparecimento do cio. Tendo em vista a possibilidade da utilização de técnicas não invasivas de monitorização de concentrações hormonais, este estudo visa o acompanhamento do perfil hormonal de fêmeas cativas de felídeos silvestres, durante o período pós-parto.



MATERIAL E MÉTODOS

Animais e Colheita de Amostras de Fezes

Os animais utilizados nesse estudo foram uma fêmea adulta de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e uma fêmea adulta de gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), alojadas individualmente no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional, localizado na cidade de Foz do Iguaçu (altitude: 173 m; 25°32'45" S; 54°35'07" W). Ferreira (1996) descreveu o clima para Foz do Iguaçu como subtropical úmido, com verões quentes e com aumento de chuvas. A pluviosidade anual está acima de 1.700 mm e não há estação seca, a umidade relativa está entre 80-90%, a média anual de temperatura é de 21°C (15°C no inverno, 25°C no verão) e durante o verão as temperaturas máximas podem exceder 42°C (WHN, 1983). Categoria reprodutiva e idade estimada para cada fêmea são apresentadas na Tabela 1. Cada fêmea foi definida como procriadora caso tivesse produzido filhote previamente, ou não procriadora, caso não tivesse produzido filhote após ter sido acasalada. A idade é referida em anos no momento em que a coleta de dados foi iniciada. A idade da fêmea proveniente da natureza é uma estimativa baseada no número de anos em cativeiro.

TABELA 1. Informação geral sobre as fêmeas de gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá utilizadas nesse estudo

Espécie	Idade (anos)	Peso corporal (kg)	Categoria reprodutiva ²
Gato-do-mato-pequeno	2,5	2,6	P
Gato-maracajá	> 3	2,8	ND

²P, procriadora; ND, não determinada



As fêmeas foram mantidas sob condições de fotoperíodo natural e alimentadas uma vez por dia, sem dia de jejum. A alimentação era constituída por carne bovina crua, suplemento mineral e vitamínico e água à vontade (ver ANEXOS). Os recintos apresentavam as seguintes dimensões: 6,92 X 2,87 m e 2,55 m de altura para gato-do-mato-pequeno; 7,00 X 2,95 m e 4,15 m de altura para gato-maracajá; enriquecidos com troncos e contendo um cambiamento.

As amostras fecais foram coletadas de cada fêmea cinco dias por semana, para caracterizar as atividades esteroideogênica gonadal e adrenocortical. Foram registrados comportamentos, associados ou não com o estro, como esfregar-se contra objetos, vocalização, rolamento, andar de modo repetitivo, atividade com membros torácicos e pélvicos, micção com maior frequência, borrifar urina, atividade de investigação (ex.: cheirar) e lordose, observados durante os procedimentos de rotina. Após a colheita, as amostras foram colocadas em sacos plásticos tipo "zip" e imediatamente congeladas e armazenadas (-20 °C), até o subsequente transporte em gelo seco para o Laboratório de Endocrinologia do *Smithsonian Institution - Conservation and Research Center*, onde foram analisadas.

Análise hormonal

A extração dos hormônios fecais seguiu a metodologia descrita no capítulo 1. As dosagens hormonais foram realizadas conforme os métodos descritos nos capítulos 2 e 3, ou seja, através de radioimunoensaio para progestágeno e corticosterona; e enzimoimunoensaio para estrógeno.



RESULTADOS

Os perfis de estrógeno excretado, metabólitos de progestágeno e corticosterona em fezes úmidas para gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá estão apresentados nas Figs. 1 e 2, respectivamente. Para a fêmea de gato-do-mato-pequeno, a concentração de progestágeno, cinco dias antes do parto, era de 447,7 µg/g; sendo que quatro dias após o parto esse valor decresceu para 56,6 µg/g. Para a fêmea de gato-maracajá, a concentração de progestágeno, dez dias antes do parto, era de 794,9 µg/g; sendo que um dia antes do parto decresceu para 59,5 µg/g e nove dias após o parto estava em 47,8 µg/g.

A separação do filhote de gato-maracajá foi realizada 94 dias após o parto, sendo que essa fêmea apresentou um pico na concentração de estrógeno 14 dias após a remoção do filhote. Na seqüência, foram observados picos consecutivos de estrógenos, sendo que a duração do ciclo estral, baseada no intervalo entre picos consecutivos de estrógeno foi de $16,5 \pm 1,9$ dias (variação, 14-18 dias; n = 4 ciclos).

A fêmea de gato-do-mato-pequeno apresentou altas concentrações de corticóides fecais próximo do momento do parto e concentrações de estrógeno sempre basais durante os 47 dias finais da gestação e os três meses seguintes ao parto. A fêmea de gato-maracajá apresentou altas concentrações de corticóides fecais próximo do momento do parto e da separação do filhote, caracterizando duas situações de estresse.

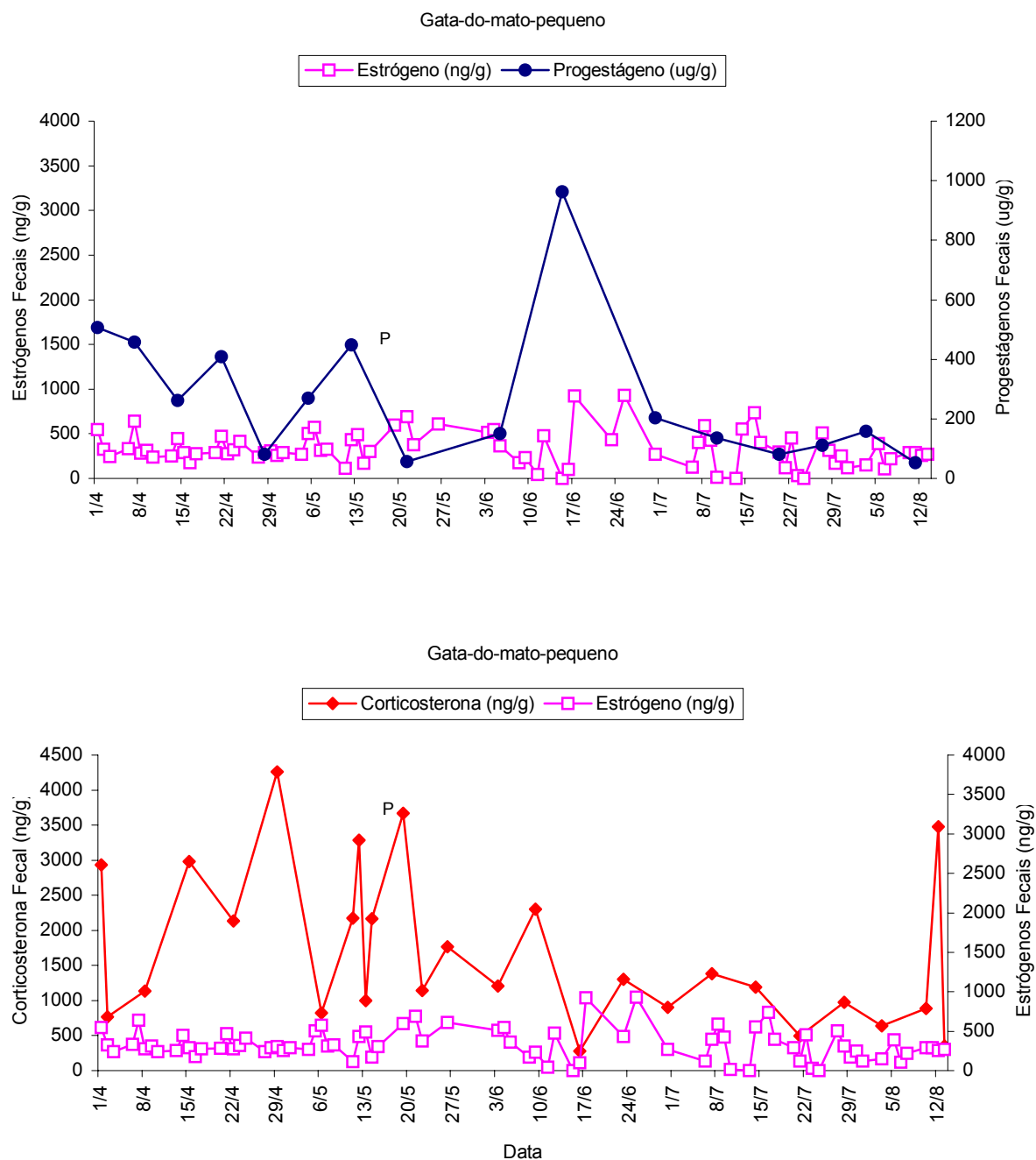


Fig. 1. Perfis da excreção fecal de estrógeno (quadrados vazios), progestágeno (círculos preenchidos) e corticosterona (losangos preenchidos) em fêmea de gato-do-mato-pequeno. A letra P representa o parto.

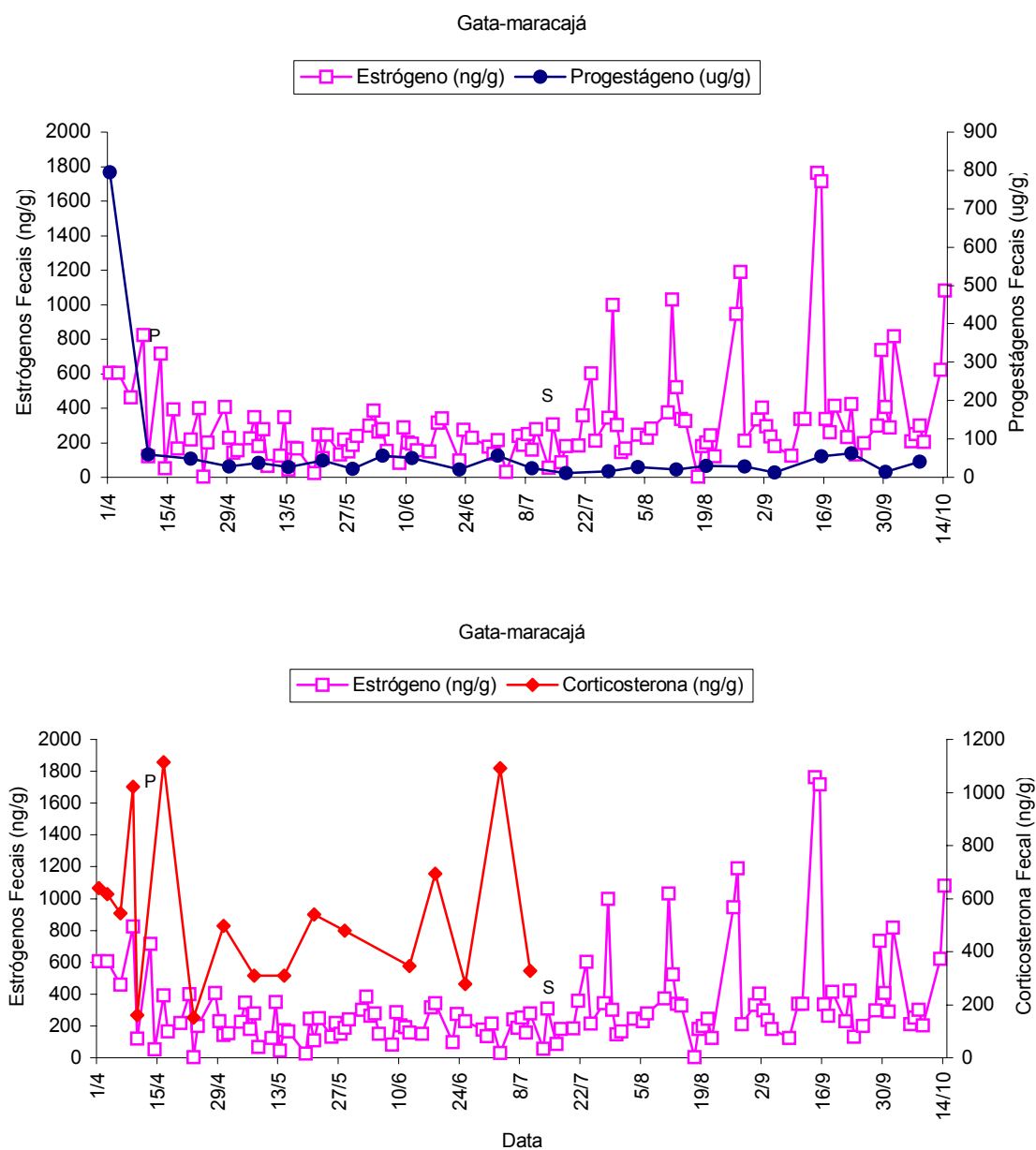


Fig. 2. Perfis da excreção fecal de estrógeno (quadrados vazios), progestágeno (círculos preenchidos) e corticosterona (losangos preenchidos) em fêmea de gato-maracajá. A letra P representa o parto e a letra S a separação do filhote.



DISCUSSÃO

Esse método não invasivo de monitorização da função ovariana e adrenal forneceu informações valiosas na endocrinologia reprodutiva do gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá e demonstrou que a mensuração de estrógeno, corticosterona e metabólitos fecais de progestágenos, é um método confiável de acessar a função reprodutiva e adrenal nessas espécies.

Esse estudo apresenta perfis hormonais de estrógeno, progestágenos e corticosterona durante a fase final da gestação, parto e pós-parto. Esses perfis podem ser utilizados como parâmetros, expandindo, dessa forma, nosso conhecimento da fisiologia reprodutiva dessas espécies. Os metabólitos foram mensurados em amostras fecais utilizando um método de extração antes da análise por EIA (estrógeno) e RIA (progestágenos e corticosterona). Os resultados confirmaram que esse método não invasivo, como descrito para muitas outras espécies (Schwarzenberger et al., 1996, 1997), é aplicável para a monitorização da condição reprodutiva no gato-do-mato-pequeno e no gato-maracajá. Os resultados também indicaram que a atividade do ovário e placenta pode ser avaliada suficientemente através da análise de amostras fecais, com frequência diária para estrógeno e semanal para progestágenos.

A avaliação combinada de estrógenos e progestágenos fecais pode fornecer informação valiosa sobre a condição reprodutiva de um animal e auxilia a diagnosticar irregularidades na ciclicidade ovariana (Capítulo 4). Pode também ser possível utilizar a onda de estrógeno durante o estro (Capítulo 2) como auxílio para estimar o melhor período para o acasalamento, diminuindo dessa forma as possibilidades de agressões entre macho e fêmea. As fêmeas de pequenos felídeos geralmente não exibem sinais visíveis de estro, portanto, a mensuração de estrógenos poderia facilitar o manejo reprodutivo, mas seria necessário um laboratório equipado e análises diárias.

Para as duas espécies, os níveis de progestágenos decrescem com a proximidade do parto e permanecem em níveis basais durante o período pós-parto. Na fêmea de gato-maracajá observou-se, após a separação do filhote, o retorno da atividade ovariana. Provavelmente, a lactação esteve envolvida na supressão da atividade ovariana durante o período pós-parto, o que pode ser explicado pela influência inibitória da prolactina sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário (Davidson & Stabenfeldt, 1999).



As altas concentrações encontradas de corticosterona próximo ao parto sugerem sua participação no mecanismo desencadeador do parto, bem como o estresse concomitante envolvido.

O período próximo ao parto pode ser estimado através do decréscimo de progestágenos fecais e o período apropriado para o acasalamento pode ser determinado pelo aumento de estrógenos fecais. Os perfis hormonais de estrógeno e progestágeno durante gestação, parto e pós-parto em gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá assemelham-se aos perfis apresentados por outras espécies deste táxon (guepardo, Brown et al., 1996; puma, Bonney et al., 1981; leão, Schmidt et al., 1979).

Podemos observar que durante os períodos em que as concentrações de corticosteróides estavam elevadas as fêmeas não ciclaram (Capítulo 4). Não podemos esquecer do efeito inibitório concomitante da prolactina, que apresenta níveis elevados durante o final da gestação e lactação e dos progestágenos, com concentrações decrescentes do terço final da gestação ao momento do parto.

O retorno à ciclicidade ovariana após a remoção do filhote em gato-maracajá sugere este ser um bom período para a introdução do macho, com objetivo de maximizar a eficiência reprodutiva. Essa informação é importante para o planejamento reprodutivo, porque introduções de parceiro em períodos inadequados podem levar à apatia reprodutiva ou agressão. A duração do ciclo estral da fêmea de gato-maracajá foi próxima à descrita para a espécie (Moreira et al., 2001).

Esse estudo contribui para o conhecimento das características reprodutivas, baseadas em análises de estrógeno e progestágeno fecais, associadas aqui à corticosterona, para essas espécies ameaçadas de extinção. O aumento do sucesso reprodutivo em cativeiro dessas espécies é necessário para a sustentação e ampliação do atual banco de reserva genômica, evitando a necessidade da retirada de animais da natureza e fornecendo material para futuros projetos de reintrodução e/ou translocação.



CONCLUSÕES

1. As análises de estrógeno fecal durante o período pós-parto em gato-maracajá, indicaram o retorno da atividade ovariana após a separação do filhote, existindo portanto uma provável influência inibitória da lactação sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário.
2. O retorno à ciclicidade ovariana após a remoção do filhote em gato-maracajá, define este como um bom período para a introdução do macho, com objetivo de maximizar a eficiência reprodutiva.
3. O aumento das concentrações de corticosterona próximo do momento do parto para ambas as espécies sugere sua participação no mecanismo desencadeante, bem como o concomitante estresse envolvido.
4. Os perfis hormonais apresentados durante gestação, parto e pós-parto nessas duas espécies assemelham-se muito em linhas gerais aos de outros felídeos, sugerindo que esses mecanismos sejam conservados dentro do táxon, apesar de que as taxas de produção, metabolismo e/ou excreção de esteróides sejam mais espécie-específicas.

REFERÊNCIAS

1. Bonney, R.C., Moore, H.D.M., Jones, D.M. (1981) Plasma concentrations of oestradiol-17 β and progesterone, and laparoscopic observations of the ovary in the puma (*Felis concolor*) during oestrus, pseudopregnancy and pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility* 63:523-531.
2. Brown, J.L., Wildt, D.E., Wielebnowski, N., Goodrowe, K.L., Graham, L.H., Wells, S., Howard, J.G. (1996) Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. *Journal of Reproduction and Fertility* 106:337-346.
3. Davidson, A.P., Stabenfeldt, G.H. (1999) Gestação e parto. In: Cunningham, J.G., editor. *Tratado de fisiologia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. pp 377-384
4. Greco, D., Stabenfeldt, G.H.. (1999) Glândulas endócrinas e suas funções. In: Cunningham, J.G., editor. *Tratado de fisiologia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. pp 324-352.
5. Moreira, N., Monteiro-Filho, E.L.A., Moraes, W., Swanson, W.F., Graham, L.H., Pasquali, O.L., Gomes, M.L.F, Morais, R.N., Wildt, D.E., Brown, J.L. (2001) Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. *Zoo Biology* 20:103-116.
6. Schmidt, A.M., Nadal, L.A., Schmidt, M.J., Beamer, N.B. (1979) Serum concentrations of oestradiol and progesterone during the normal estrous cycle and early pregnancy in the lion (*Panthera leo*). *Journal of Reproduction and Fertility* 57:267-272.
7. Schwarzenberger, F., Möstl, E., Palme, P., Bamberg, E. (1996) Faecal steroids analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Anim. Reprod. Sci.* 42:515-526.
8. Schwarzenberger, F., Palme, P., Bamberg, E., Möstl, E. (1997) A review of faecal progesterone metabolite analysis for non-invasive monitoring of reproductive function in mammals. *Intern. J. Mamm. Biol. Suppl. II*, 214-221.



6. Reprodução em fêmeas de pequenos felídeos sul-americanos

INTRODUÇÃO

As 37 espécies de felídeos modernos evoluíram de aproximadamente oito linhagens filogenéticas nos últimos 10 a 15 milhões de anos.⁶⁰ Em relação à conservação, todos os pequenos felídeos neotropicais estão incluídos nos Apêndices I ou II do CITES⁴⁷, estando ameaçados na natureza principalmente devido à perda de habitat e pressão de caça.

Muitas destas espécies não recebem atenção especial nos zoológicos porque não instigam grande atenção do público. Na maioria das vezes, apresentam atividades crepusculares ou noturnas e uma natureza reclusa, ficando escondidos ou descansando durante os períodos diários de visita. As populações de pequenos felídeos em cativeiro são freqüentemente compostas por menos que 50 animais e são amplamente dispersas geograficamente, tornando-os difíceis de estudar cientificamente.⁶² Ironicamente, alguns animais que reproduzem bem em cativeiro não são acasalados, devido à não existência de espaço suficiente nos zoológicos para mantê-los.

Historicamente, os pequenos felídeos sul-americanos têm sido caracterizados por seu baixo desempenho reprodutivo em cativeiro. A porcentagem de nascimentos na população cativa é baixa e o sucesso da reprodução imprevisível. Registros reprodutivos para a população de pequenos felídeos em zoológicos brasileiros mostram que há uma pequena porcentagem de nascimentos, associada com uma alta taxa de mortalidade nos primeiros 30 dias (Prefácio Geral). Dessa forma, o desempenho reprodutivo não é confiável e as particularidades que envolvem os êxitos e fracassos na reprodução em cativeiro são pouco compreendidas. Considerando o alto valor genético da população em cativeiro de pequenos felídeos na América do Sul, com muitos indivíduos provenientes da natureza e/ou com origem conhecida e o aumento da ênfase no papel da reprodução em cativeiro como uma ferramenta da conservação, o sucesso na reprodução tornou-se obrigatório. No Brasil, o nacionalmente coordenado Plano de Manejo de Pequenos Felídeos é responsável pela manutenção e análise das informações apropriadas. Ele organiza e suporta programas de



conservação com uma avaliação real do tamanho, origem, estado sanitário e condições de recinto da população em cativeiro.

Uma melhor compreensão da fisiologia reprodutiva dos pequenos felídeos neotropicais é necessária para obter-se um desempenho reprodutivo mais consistente em cativeiro, aumentar o número de indivíduos que reproduzem na população e para que técnicas de reprodução assistida (ex.: inseminação artificial, fertilização *in vitro*) sejam aplicadas com maior sucesso. Em guepardos (um felídeo africano), muitos dos efeitos fenotípicos atribuídos à depressão por consangüinidade, tais como infertilidade, tamanhos de ninhada reduzidos e aumento da suscetibilidade a doenças, são limitados aos indivíduos cativos e podem ser explicados como artefatos fisiológicos ou comportamentais do cativeiro.³⁷

O borrifamento de urina é a forma predominante de marcação através do odor em fêmeas de vida livre, cuja frequência varia durante o ano e parece estar relacionada com variações no ciclo reprodutivo. A frequência de marcação aumenta dramaticamente durante o período reprodutivo e é baixa durante a prenhez, podendo estar inteiramente ausente quando a fêmea está criando o(s) filhote(s). Isso indica fortemente uma função primária no anúncio da condição reprodutiva da fêmea, embora um papel adicional na manutenção do espaço social seja sugerido. Em uma fêmea de gato-de-patas-negras (*Felis nigripes*, "black-footed cat") da África, essas marcas olfativas não estavam restritas às bordas da área de vida do animal, mas correspondiam àquelas áreas utilizadas mais intensamente durante o ano.³⁹

CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS GERAIS

Os dados reprodutivos gerais estão apresentados na Tabela 1. Historicamente, o gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) e a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) têm reproduzido e criado filhotes de forma mais consistente em cativeiro, quando comparados a outras espécies de pequenos felídeos neotropicais, como o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e o gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), que são mais difíceis de reproduzir em cativeiro. O gato-palheiro (*Oncifelis colocolo*) é raro ao longo de toda a sua distribuição e o gato-do-mato-grande (*Oncifelis geoffroyi*) é raro no Brasil.⁵⁹

TABELA 1. Dados reprodutivos para pequenos felídeos sul-americanos

Espécie (Status)	Nome científico ⁷⁰	Duração do estro (dias)	Duração do ciclo estral (dias)	Gestação (dias)	Número de filhotes por ninhada (média ± SEM*)
Gato-do-mato- pequeno ou Tigrina (CITES** Apêndice I; IUCN - Vulnerável)	<i>Leopardus tigrinus</i> (Schreber, 1775)	3 - 9 ¹⁷	16,4 ± 1,2 ⁴³	73-78 ²² 55-60 ⁶⁵ 62-74 ³³	1,06 ³⁶ ; 1-2, um mais comum ^{33, 22}
Jaguaririca (CITES Apêndice I; IUCN - Vulnerável)	<i>Leopardus pardalis</i> (Linnaeus, 1758)	4,63 ± 0,63 ³⁶ 7-10 ¹²	25,11 ± 4,33 ³⁶ 42 ¹² 19,9 ± 1,8 ⁴³	70-85 ^{36, 25, 16, 22} 79-85 ⁴⁰	1,4 ¹² 1,67 ± 0,21 ³⁶ 1-2 ^{40, 16, 25}
Gato-maracajá (CITES Apêndice I; IUCN - Vulnerável)	<i>Leopardus wiedii</i> (Schinz, 1821)	4-10 ^{36, 16, 49}	32-36 ^{36, 16, 49, 50} 17,6 ± 1,5 ⁴³	76-84 ^{36, 16, 49}	1 ^{36, 13, 10, 51} 1-2 ^{16, 49, 40}
Gato-do-mato- grande (CITES Apêndice I)	<i>Oncifelis geoffroyi</i> (d'Orbigny & Gervais, 1844)	2,50 ± 0,50 ³⁶ 1-12 ^{1, 31, 18}	20 ³⁶ 23-29 ¹⁷	62-78 (maioria em 71-78 dias) ^{36, 22, 57, 1, 31, 55}	2,31 ± 0,13 ³⁶ 1,5 (1-3) ^{1, 17}

Continuação da TABELA 1.

Espécie (Status)	Nome científico ⁷⁰	Duração do estro (dias)	Duração do ciclo estral (dias)	Gestação (dias)	Número de filhotes (média ± SEM*)
Gato-mourisco ou jaguarundi (Fig. 1) (CITES Apêndice II; IUCN - Indeterminado)	<i>Herpailurus yagouaroundi</i> (Lacépède, 1809)	$3,17 \pm 0,75^{36}$	$53,63 \pm 2,41^{36}$	70-75 ²⁸ 63-70 ⁴⁶ 86 (Cassaro, dados não publicados)	$1,83 \pm 0,24^{36}$ 1-4 ^{25, 22, 28}
Gato-palheiro ou gato-dos-pampas (CITES Apêndice II)	<i>Oncifelis colocolo</i> (Molina, 1782)			80-85 ²²	$1,31 \pm 0,13^{36}$ 1-3 ^{4, 13, 54}
"Kodkod" (CITES Apêndice II)	<i>Oncifelis guigna</i> (Molina, 1782)			72-78 ⁵³	1-3 ⁵³ ; 3-4 ²⁷ 2-3 ⁵⁵
Gato-dos-Andes (CITES Apêndice I; IUCN - Raro)	<i>Oreailurus jacobita</i> (Cornalia, 1865)			63-70 ⁵⁶	2-4 ⁵⁶

*SEM = erro padrão da média

**CITES ("Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora") = Acordo sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Fauna e Flora Silvestres



FIGURA 1. Gato-mourisco ou jaguarundi (*Herpailurus yagouaroundi*).

A puberdade está correlacionada com o peso corporal, ocorrendo mais cedo nas fêmeas. Para o gato-do-mato-grande (*Oncifelis geoffroyi*), a idade média relatada pelo Sistema Internacional de Informação sobre as Espécies (ISIS) foi de 50 meses para machos e 47 meses para fêmeas, mas ambas podem ser reduzidas por uma nutrição melhorada. A reprodução freqüentemente continua até 16 anos de idade ou mais. A natureza sazonal do ciclo reprodutivo de gatos domésticos em liberdade é dependente primariamente do fotoperíodo,²⁴ embora outro aspecto importante quando consideramos felídeos de vida livre seja a disponibilidade de presas. Através do estudo de hormônios esteróides reprodutivos e atividade ovariana em fêmeas de gato-do-mato-pequeno, jaguatirica e gato-maracajá em cativeiro foi possível observar que essas espécies não apresentam um padrão característico de sazonalidade reprodutiva, portanto tentativas de reprodução podem ser conduzidas durante todo o ano.⁴³

O desenvolvimento de métodos de análise de esteróides fecais para avaliação da função ovariana em felídeos possibilita a geração de bases de dados, além da correlação com outros fatores, como ambiente em cativeiro, sazonalidade, nutrição e



comportamento.^{23, 45, 11, 3, 21} A monitorização hormonal fecal não invasiva evita o estresse de colheitas periódicas de sangue, possíveis distúrbios na secreção hormonal e no comportamento em decorrência dos procedimentos de contenção.

As fêmeas de gato-do-mato-pequeno, jaguatirica e gato-maracajá são poliétricas e os intervalos e variações entre picos de excreção de estrógeno estão apresentados na Tabela 2.⁴³

TABELA 2. Intervalos e variações entre picos de excreção de estrógeno para fêmeas de gato-do-mato-pequeno, jaguatirica e gato-maracajá

Espécie	Intervalo entre picos de excreção de estrógeno (dias) ^a	Variação entre picos de excreção de estrógeno (dias)
<i>L. tigrinus</i> (gato-do-mato-pequeno)	16,7 ± 1,3	11-27
<i>L. pardalis</i> (jaguatirica)	18,4 ± 1,6	7-31
<i>L. wiedii</i> (gato-maracajá)	26,1 ± 3,5 ^b	11-55

^aMédia ± SEM (erro padrão da média)

^bIncluindo as fases luteais não induzidas por cópula

Gato-do-mato-pequeno e jaguatirica, como a maioria dos felídeos, parecem ser primariamente ovuladores induzidos com a ovulação ocorrendo apenas após um estímulo copulatório. Os níveis de estrógeno flutuam em fêmeas não acasaladas refletindo ondas de crescimento folicular e regressão, enquanto as concentrações de progestágeno permanecem basais em gatos-do-mato-pequeno e jaguatiricas. Já as fêmeas de gato-maracajá podem apresentar altos níveis de metabólitos fecais de progestágeno, refletindo ovulações espontâneas (Fig. 2).⁴³

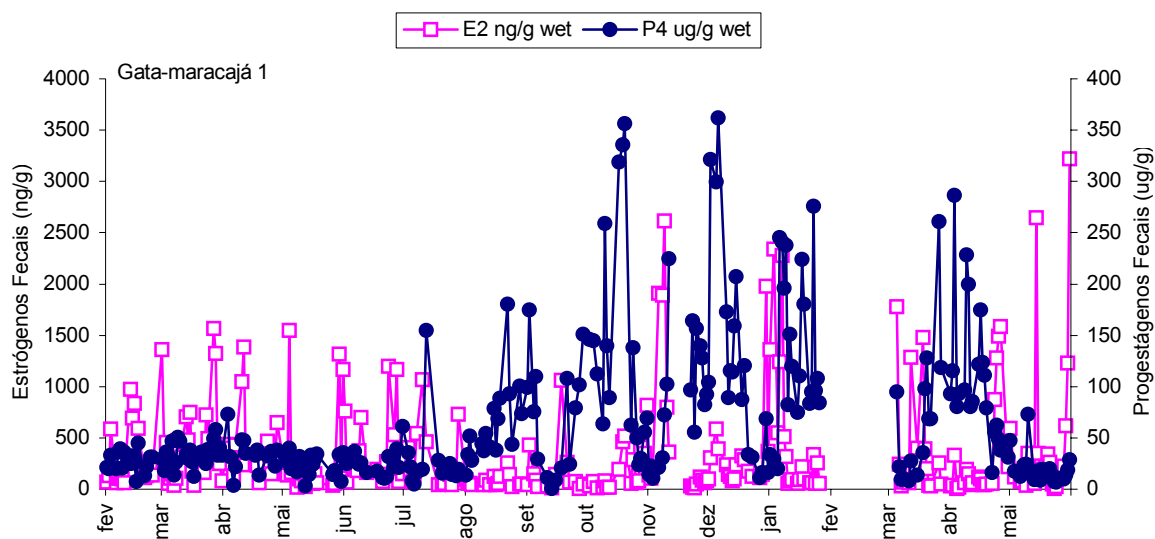


FIGURA 2. Perfil durante longo período de estrógeno fecal (quadrados vazios) e de excreção de progestágeno (círculos preenchidos) em uma fêmea de gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) mantida isolada. Esta fêmea apresentou atividade ovariana durante todo o ano e ovulações espontâneas especialmente de agosto a abril.

Sinais de cio e comportamentos durante o acasalamento são descritos como um tanto uniformes entre as espécies de felídeos e similares àqueles do gato doméstico¹⁵. Repertórios comportamentais associados com o estro incluem rolamento no solo, esfregar-se contra objetos, vocalização, andar de modo repetitivo, atividade com membros torácicos e pélvicos, comportamento de auto-limpeza, micção com maior frequência, borrifamento de urina, atividade investigativa (ex.: cheirar) e lordose³⁸.

O cio na maioria dessas espécies tem sido identificado como "silencioso", ou as fêmeas mostram sinais sutis, difíceis para serem identificados na prática ou em procedimentos de rotina. Algumas espécies como, por exemplo, as jaguatiricas, podem apresentar alguns sinais comportamentais de estro, como se esfregar contra objetos, vocalizar, rolar, borrifar urina e cheirar de um modo mais perceptível, que podem estar associados com interesse pelo macho, além de despertar o interesse do mesmo.



Entretanto, como em guepardos,⁶⁷ a frequência e característica dos comportamentos correlatos varia através das fêmeas, não revelando nenhum comportamento único indicativo de estro, ao contrário, algumas fêmeas mostram uma grande variedade de comportamentos quando as concentrações de estrógeno estão elevadas. Embora a monitorização comportamental do estro seja possível em pequenos felídeos silvestres, freqüentemente é difícil (principalmente em fêmeas mantidas isoladas) e consome muito tempo devido às variações individuais e alterações sutis nas frequências comportamentais ao invés de alterações nos tipos de comportamentos exibidos³⁶.

O estro silencioso torna difícil a escolha do momento oportuno para introduções de pares cativos que, em casos de incompatibilidades comportamentais, podem resultar em injúrias por luta ou mesmo morte. Considerando isso, as introduções iniciais com fins reprodutivos devem ser cuidadosamente monitoradas. Outro aspecto que deve ser considerado, caso ocorra a concepção, é a possibilidade da fêmea ou o macho matar o(s) filhote(s) em uma situação estressante.

SUGESTÕES PARA O MANEJO REPRODUTIVO (CONSTRUÇÃO DOS RECINTOS E ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL, PROTOCOLO PARA REPRODUÇÃO)

Em guepardos, acredita-se que fatores comportamentais e de manejo (fatores extrínsecos) sejam os principais contribuintes para a reprodução com sucesso em cativeiro.^{9, 30, 34, 66} O enriquecimento ambiental pode aumentar o sucesso na reprodução, diretamente por prover ambientes sociais e físicos necessários para comportamento reprodutivo e cuidado parental bem sucedidos e, indiretamente, fornecendo ambiente adequado requerido para o crescimento de adultos com comportamento normal e, portanto, reprodutivamente viáveis.⁸

Muitos aspectos devem ser considerados no planejamento ou adequação de recintos para reprodução de pequenos felídeos. Desde que fatores possivelmente estressantes devam ser eliminados ou evitados, uma rotina de cuidados com perturbação mínima deve ser aplicada e recintos localizados em área fora de visitação devem ser adotados. Felídeos estressados por manipulações imprevistas apresentaram concentrações elevadas de cortisol e



sensibilidade reduzida da hipófise ao LHRH.⁷ Além disso, contato físico e visual deve ser evitado entre recintos adjacentes, uma consideração importante para fêmeas gestantes e em lactação. Em alguns zoológicos, espécies de pequenos felídeos são alojadas próximas a grandes felídeos, como a onça-pintada, causando uma condição de estresse crônico, considerando que grandes felídeos são potenciais predadores na natureza. Carlstead et al.⁶ descobriram que o fornecimento de locais de esconderijo para gatos-leopardo ("leopard cats", *Prionailurus bengalensis*) que estavam estressados pela presença próxima de espécies de grandes felídeos (*Panthera* spp.) resultou em menor deambulação e níveis reduzidos de cortisol. Perspicácia na melhoria de ambientes de cativeiro e compreensão de como ambientes específicos afetam o comportamento e saúde devem ter como base uma síntese da informação obtida na natureza e em cativeiro.¹⁹

Um objetivo do enriquecimento ambiental é tornar o repertório comportamental e os padrões de atividade de animais cativos tão próximos quanto possível dos seus contrapartes de vida livre. Visto que animais de zoológico apresentam um repertório comportamental muito mais simples quando comparados aos de vida livre, a modificação das circunstâncias de alimentação deveria ser uma das mais altas prioridades em projetos de enriquecimento ambiental em zoológicos.⁴⁴ Como enriquecimento alimentar, presas mortas, como pintainho de um dia, peixe e camundongo podem ser escondidos ao redor do recinto, para gerar motivação e, conseqüentemente, o comportamento de busca.²⁰ A alimentação sem horário padronizado evita também a ansiedade próxima aos períodos de rotina. Enriquecimento comportamental e ambiental efetivo pode reduzir comportamentos estereotipados (repetição persistente de atos sem sentido) e promover padrões comportamentais que lembram aqueles de felídeos em vida livre.⁶⁹

Troncos e galhos inclinados de árvore são usados para aumentar o espaço útil no interior dos recintos e para prover acesso a caixas suspensas, não esquecendo que muitas espécies de pequenos felídeos, como o gato-maracajá, possuem também hábitos arborícolas. Um piso com solo natural, quando possível, é preferido. Vegetação como substrato é importante para enriquecer o ambiente e capim pode ser fornecido como um alimento complementar (E.L.A. Monteiro-Filho, comunicação pessoal). Prateleiras podem ser colocadas estrategicamente no recinto para permitir que cada animal descansa no sol ou na sombra.



Alguns pequenos felídeos podem ocasionalmente apresentar severa perda de pelo, provavelmente por arrancamento, que pode estar relacionado ao estresse, porque freqüentemente ocorre durante o período mais quente do ano. Determinou-se que gatos domésticos adultos perdem 28,1 g de pelo por kg de massa corporal com dois terços da perda total de pelos encontrada nas fezes. Alterações na pelagem do gato durante o ano são otimamente reguladas para obter a cobertura mais densa no período mais frio do ano e a cobertura mais esparsa no período mais quente.²⁶

Na introdução de pares pela primeira vez, é aconselhável colocá-los previamente em recintos adjacentes com algum contato visual, olfativo e físico. Outro método de introdução com propósito reprodutivo consiste em permitir a cada indivíduo acesso ao recinto do outro, inicialmente na ausência do outro indivíduo, mas culminando no acesso simultâneo. O método do conhecimento gradual através de uma sobreposição de território experimentalmente induzida pode ser efetiva no caso de machos com histórico de agressão.³²

Interações sociais podem representar uma parte importante na estimulação ou inibição da demonstração do cio. Fêmeas, particularmente as mantidas isoladas, podem mostrar indução do estro se alojadas próximo ou com um macho, ou ao menos com contato visual, olfativo e sonoro. De modo contrário, o estro pode ser suprimido se uma subordinada é alojada com uma fêmea dominante. Considerando que pequenos felídeos neotropicais na natureza são principalmente solitários, machos e fêmeas deveriam ser alojados isoladamente em recintos separados e apresentados um ao outro apenas para cruzamento. Outra consideração é que manter pequenos felídeos juntos por um longo período pode resultar em interesse sexual reduzido. A preferência pelo companheiro/a é uma explicação do insucesso do acasalamento e essa possibilidade não deve ser descartada. Considerando isso e a freqüente inabilidade em identificar com confiança quando as fêmeas estão em cio, para escolher o momento oportuno para as introduções de casais, uma sugestão tem sido introduzir o macho apenas por um período de 60 dias (W. Moraes, comunicação pessoal), evitando-se que a fêmea venha a parir na presença do macho. Se a concepção não ocorrer, o macho pode ser reintroduzido novamente após um período de, no mínimo, uma gestação. É preferível mover o macho do que uma fêmea possivelmente gestante, já que a movimentação de pequenos felídeos silvestres entre recintos pode ser estressante ou resultar em injúria durante a captura. A ultra-sonografia, a palpação abdominal, a radiografia ou a laparoscopia podem ser usadas para o diagnóstico de gestação.



A laparoscopia é uma técnica invasiva e raios-X podem ser prejudiciais à gametogênese. Prenhez já foi diagnosticada, por laparoscopia, em uma fêmea de gato-maracajá com 14 dias de gestação, sem efeitos prejudiciais.⁴² Aborto ou parição podem ocorrer e passar despercebidos se os fetos forem comidos pela fêmea ou pelo macho.

Devido às fêmeas parecerem ser particularmente sensíveis a distúrbios quando estão criando, um protocolo de manejo similar para a separação de fêmeas foi desenvolvido para o gato-palheiro (*Oncifelis colocolo*) no Zoológico de Cincinnati. Um par é alojado na exibição por 65 dias, após o que a fêmea é transferida para um recinto fora de exibição para os próximos 90 dias.⁵ Privacidade total para fêmea e filhote(s) é também descrita para o gato-maracajá como um fator importante para a reprodução com sucesso.³⁵

Sempre que possível, os filhotes devem permanecer com suas mães. Mesmo assim, um aspecto a ser considerado é que os filhotes podem ser mortos ou negligenciados pela mãe. Embora o cuidado parental do jovem seja preferido, ocasionalmente em fêmeas com um histórico de negligência materna, é necessário remover e "criar a mão" animais para assegurar sua saúde imediata e bem-estar a longo prazo. Técnicas para criar filhotes "a mão" estão documentadas na literatura.¹⁴ Porém, como conseqüências deste procedimento, os filhotes são freqüentemente mais fracos e mais suscetíveis a doenças quando comparados a filhotes criados pela mãe. Obter colostro é importante porque até o momento nenhum substituto do leite é tão bom quanto o leite natural. Este tipo de criação também evita o importante contato e treinamento entre mãe e filhote(s), o que pode interferir com o comportamento futuro. Se a mãe negligencia os filhotes, eles podem ser criados junto com filhotes de gato doméstico, e/ou por uma mãe substituta não humana em um ambiente rico e variado.³⁶ Esse fato deve ser considerado especialmente quando há planos futuros de translocação. Seidensticker e Forthman⁵⁸ sugeriram incluir a manutenção da competência comportamental em animais de zoológico como um objetivo biológico primário. Concluindo, a cooperação próxima entre países e pessoas envolvidas *ex situ* (zoológicos e criadouros) e *in situ* (programas a campo e agências de conservação de fauna) é necessária para uma conservação global efetiva.⁶¹



AValiação Reprodutiva

A avaliação inicial deve incluir exame clínico e histórico do manejo adotado. Outras abordagens são monitorar esteróides reprodutivos e examinar o trato genital por laparoscopia. A citologia vaginal pode ser utilizada para caracterizar o ciclo estral, mas também pode estimular a ovulação. O exame bacteriológico de *swabs* vaginais é de difícil interpretação em casos de suspeita de endometrite ou vaginite, porque os microrganismos envolvidos podem constituir parte da flora vaginal normal. Jaguatiricas parecem apresentar preponderância neutrofílica com maior frequência⁶⁴.

Reprodução Assistida

A reprodução assistida, se usada apropriadamente, incluindo inseminação artificial (IA), fertilização *in vitro* (IVF), transferência de embriões e banco de reserva genômica, tem aplicação para o manejo e conservação de pequenos felídeos (Figs. 3 e 4). É possível que no futuro a reprodução assistida possibilite o movimento de material genético, ao invés de animais vivos. Essas técnicas também podem ser usadas para reproduzir indivíduos incompatíveis e para infundir novo material genético em populações cativas. Devido aos felídeos serem suscetíveis a certas viroses, a reprodução assistida pode ser um dos novos métodos de reprodução usando gametas lavados e livres de patógenos.⁶⁸ Informações de fisiologia básica são essenciais para o desenvolvimento e aplicação de técnicas de reprodução assistida.⁶²

Taxas de prenhez e sobrevivência de filhotes são ainda baixas com o uso de reprodução assistida em felídeos tratados com gonadotropinas exógenas (eCG ou FSH e hCG). O eCG (gonadotropina coriônica equina) é utilizado para promover desenvolvimento folicular e o hCG (gonadotropina coriônica humana) para induzir ovulação. As dosagens de eCG ou FSH (hormônio folículo-estimulante) e LH (hormônio luteinizante) são espécie-específicas e requerem ajustes de acordo. A subdosagem não é efetiva enquanto a superdosagem carrega o risco da superovulação e de desequilíbrios hormonais.⁴¹ Foi demonstrado que altos níveis de estradiol impedem a implantação por prolongar o transporte



do zigoto no oviduto. Além disso, descobertas recentes sugerem que o hCG promove formação folicular posterior frequentemente observada após a ovulação em gatas tratadas com protocolos de eCG + hCG, possivelmente alterando o ambiente materno e diminuindo a fecundidade após procedimentos de reprodução assistida.⁶³

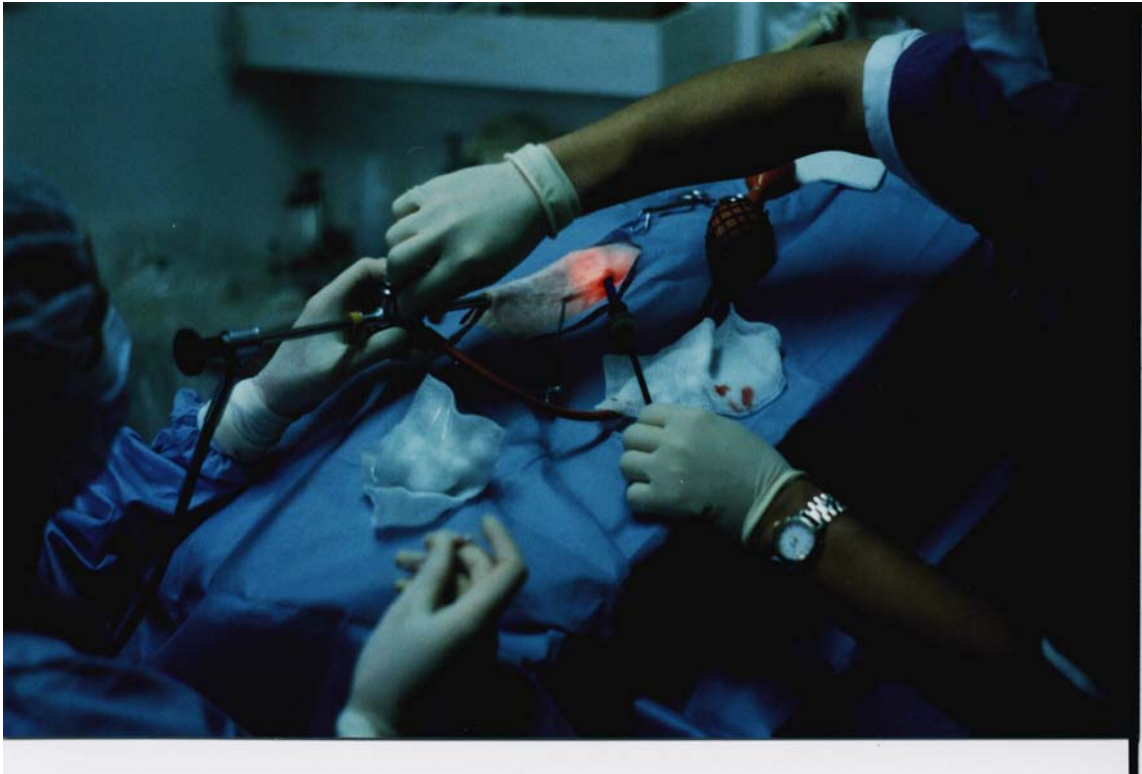


FIGURA 3. Inseminação artificial por laparoscopia em fêmea de felídeo silvestre, realizada no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional.

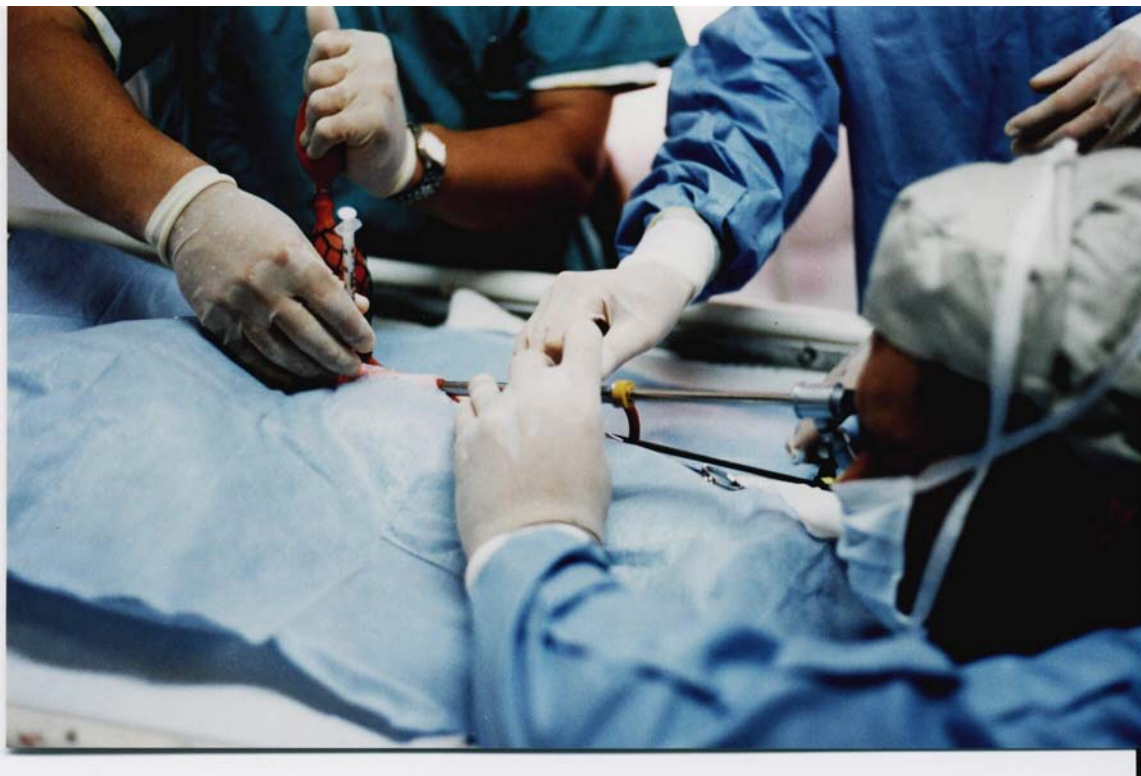


FIGURA 4. Momento da deposição do sêmen durante inseminação artificial por laparoscopia em fêmea de felídeo silvestre, realizada no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional.

CONTRACEPÇÃO

O acetato de melengestrol (MGA) é o contraceptivo mais largamente utilizado em felídeos de zoológico. Os efeitos contraceptivos do levonorgestrel têm também sido descritos na gata doméstica². As ações contraceptivas do MGA não ocorrem através da supressão da foliculogênese e, os felídeos tratados com MGA provavelmente apresentam estrógenos endógenos que podem confundir os efeitos do progestágeno no útero.²⁹ O uso do MGA está associado com lesões uterinas, incluindo câncer uterino, mas não com doença ovariana. Hiperplasia mamária pode também ocorrer após o tratamento com progestágeno.

O uso freqüente de progestágenos ou pseudogestações repetidas induzem dominância progestágena e aumentam o risco de endometrite. Prostaglandinas são indicadas para o tratamento de endometrite, embora não pareçam ter uma ação luteolítica marcante em gatas. Sua ação benéfica é mediada através de seu efeito ecbólico (promotor de contratilidade uterina).²⁴ Antibióticos de amplo espectro são geralmente administrados.



REFERÊNCIAS

1. Anderson, D. 1977. Gestation period of Geoffroy's cat *Leopardus geoffroyi* bred at Memphis Zoo. Int. Zoo Yearb. 17:164-166.
2. Baldwin, C.J.; Peter, A.T.; Bosu, W.T.K.; Dubielzig, R.R. 1994. The contraceptive effects of levonorgestrel in the domestic cat. Laboratory Animal Science 44:261-269.
3. Brown, J.L.; Wasser, S.K.; Wildt, D.E.; Graham, L.H. 1994. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured non-invasively in feces. Biology of Reproduction 51:776-786.
4. Cabrera, A.; Yepes, J. 1960. Mamíferos Sud Americanos: vida, costumbres y descripción (South American mammals: life, behaviors and description). Buenos Aires, Historia Natural Ediar, Companhia Argentina de Editores. 370pp.
5. Callahan, P.; Dulaney, M.W. 1997. Husbandry and breeding of the Pampas cat *Oncifelis colocolo* at Cincinnati Zoo and Botanical Garden. International Zoo Yearbook 35:100-103.
6. Carlstead, K.; Brown, J.L.; Seidensticker, J. 1993. Behavioral and adrenocortical responses to environmental changes in leopard cats (*Felis bengalensis*). Zoo Biology 12:321-331.
7. Carlstead, K.; Brown, J.L.; Strawn, W. 1993. Behavioral and physiological correlates of stress in laboratory cats. Applied Animal Behaviour Science 38:143-158.
8. Carlstead, K.; Shepherdson, D.J. 1994. Effects of environmental enrichment on reproduction. Zoo Biology 13:447-458.
9. Caro, T.M. 1993. Behavioral solutions to breeding cheetahs in captivity: insights from the wild. Zoo Biology 12:19-30.
10. Crespo, J.A. 1982. Ecología de la comunidad de mamíferos del Parque Nacional Iguazú, Misiones (Ecology of mammal community of the Iguassu National Park). Rev. Mus. Argent. Cienc. Nat. "Bernardino Rivadavia", Ecol. 3(2):45-162.
11. Czekala, N.M.; Durrant, B.S.; Callison, L.; Williams, M.; Millard, S. 1994. Fecal steroid hormone analysis of reproductive function in the cheetah. Zoo Biology 13:119-128.
12. Eaton, R.L. 1977. Breeding biology and propagation of the ocelot (*Leopardus [Felis] pardalis*). Zool. Garten 47:9-23.



13. Eaton, R.L. 1984. Survey of smaller felid breeding. *Zool. Garten* 54(1/2):101-20.
14. Edwards, M.S.; Hawes J. 1997. An overview of small field hand-rearing techniques and a case study for Mexican margay *Leopardus wiedii glaucula* at the Zoological Society of San Diego. *International-Zoo-Yearbook* 35:90-94.
15. Ewer, R.F. 1973. *The Carnivores*. London, Weidenfeld & Nicolson.
16. Fagen, R.M.; Wiley, K.S. 1978. Felid paedomorphosis, with special reference to *Leopardus*. *Carnivore* 1:72-81.
17. Foreman, G.E. 1988. Behavioral and genetic analysis of Geoffroy's cat (*Felis geoffroyi*) in captivity. Ph.D. Dissertation, Ohio State Univ., Columbus. 443pp.
18. Foreman G.E. 1997. Breeding and maternal behaviour in Geoffroy's cats *Oncifelis geoffroyi*. *International Zoo Yearbook* 35:104-115.
19. Forthman-Quick, D.L. 1984. An integrative approach to environmental engineering in zoos. *Zoo Biology* 3:65-77.
20. Gilkison, J.J.; White B.C.; Taylor S. 1997. Feeding enrichment and behavioural changes in Canadian lynx *Lynx canadensis* at Louisville Zoo. *International Zoo Yearbook* 35:213-216.
21. Graham, L.H.; Goodrowe, K.L.; Raeside, J.I.; Liptrap, R.M. 1995. Non-invasive monitoring of ovarian function in several felid species by measurement of fecal estradiol-17 β and progestins. *Zoo Biology* 14:223-237.
22. Green, R. 1991. *Wild cat species of the world*. Basset Publications, Plymouth, U.K. 163pp.
23. Gross, T.S. 1992. Development and use of faecal steroid analyses in several carnivore species. *Proceedings of the 1st International Symposium on Faecal Steroid Monitoring in Zoo Animals*. Royal Rotterdam Zoological and Botanical Gardens, Rotterdam, Germany, pp. 55-61.
24. Gruffydd-Jones, T.J. 1993. Disorders of the reproductive system. In J. Wills, A. Wolf, eds. *Handbook of feline medicine*. Oxford, Pergamon Press, pp. 213-222.
25. Guggisberg, C.A.W. 1975. *Wild cats of the world*. New York, Taplinger Publ. Co., 328pp.
26. Hendriks, W.H.; Tarttelin, M.F.; Moughan, P.J. 1998. Seasonal hair loss in adult domestic cats (*Felis catus*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 79:92-101.
27. Housse, P.R. 1953. [*Wild animals of Chile*.] Ediciones Univ. de Chile, Santiago (in Spanish).



28. Hulley, J.T. 1976. Maintenance and breeding of captive jaguarundis *Felis yagouaroundi* at Chester Zoo and Toronto. *Intl. Zoo Yearb.* 16:120-122.
29. Kazensky C. A.; Munson L.; Seal U. S. 1998. The effects of melengestrol acetate on the ovaries of captive wild felids. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 29:1-5.
30. Laurenson, M.K. 1993. Early maternal behavior of wild cheetahs: implications for captive husbandry. *Zoo Biology* 12:31-43.
31. Law, G.; Boyle, H. 1983. Breeding the Geoffroy's cat (*Felis geoffroyi*) at Glasgow Zoo. *Int. Zoo Yearb.* 23:191-195.
32. Law, G.; Tatner, P. 1998. Behaviour of a captive pair of clouded leopards (*Neofelis nebulosa*): Introduction without injury. *Animal Welfare* 7:57-76.
33. Leyhausen, P.; Falkena, M. 1966. Breeding the Brazilian ocelot-cat *Leopardus tigrinus* in captivity. *Int. Zoo Yearb.* 6:176-182.
34. Lindburg, D.G.; Durrant, B.S.; Millard, S.E.; Oosterhuis, J.E. 1993. Fertility assessment of cheetah males with poor quality semen. *Zoo Biology* 12:97-103.
35. Mansard, P. 1997. Breeding and husbandry of the Margay *Leopardus wiedii yucatania* at the Ridgeway Trust for Endangered Cats, Hastings. *International Zoo Yearbook* 35:94-100.
36. Mellen, J.D. 1989. Reproductive behavior of small captive exotic cats (*Felis* spp.). Doctoral thesis, University of California, Davis. 161pp.
37. Merola, M. 1994. A reassessment of homozygosity and the case for inbreeding depression in the cheetah, *Acinonyx jubatus*: Implications for conservation. *Conservation Biology* 8:961-971.
38. Michael, R.P. 1961. Observations upon the sexual behaviour of the domestic cat (*Felis catus* L.) under laboratory conditions. *Behaviour* 18:1-24.
39. Molteno, A.J.; Sliwa, A.; Richardson, P.R.K. 1998. The role of scent marking in a free-ranging, female black-footed cat (*Felis nigripes*). *Journal of Zoology* 245:35-41.
40. Mondolfi, E. 1986. Notes on the biology and status of the small wild cats in Venezuela. In S.D. Miller, D.D. Everet, eds. *Cats of the world: biology, conservation and management*. Washington, Natl. Wildl. Fed., pp. 125-146.
41. Moraes, W.; Morais, R.N.; Moreira, N.; Lacerda, O.; Gomes, M.L.F.; Mucciolo, R.G.; Swanson, W.F. 1997. Successful artificial insemination after exogenous gonadotropin treatment in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrina*). In

- Proceedings American Association of Zoo Veterinarians. Houston, TX, AAZV, pp. 334-336.
42. Moreira, N.; Moraes, W.; Santos, L.C. 1994. Estudo de parâmetros reprodutivos de *Felis tigrina*, *Felis pardalis* e *Felis wiedii*. Nota prévia (Study of reproductive parameters in *Felis tigrina*, *Felis pardalis* and *Felis wiedii*. Previous note). In Proceedings XVIII Brazilian Congress of Zoological Society. Rio de Janeiro, RJ, SZB, p. 59.
43. Moreira, N.; Monteiro-Filho, E.L.A.; Moraes, W.; Swanson, W.F.; Graham, L.H.; Pasquali, O. L.; Gomes M.L.F.; Morais, R.N.; Wildt, D.E.; Brown, J.L. 2001 Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. Zoo Biology 20:103-116.
44. Morimura, N.; Ueno, Y. 1998. Behavior patterns of 9 mammals in the zoo: The comparison among species, and different environments. Japanese Journal of Animal Psychology 48:33-45.
45. Möstl, E.; Lehman, H.; Wenzel, U. 1993. Gestagens in the faeces of mink and cats for monitoring corpus luteum activity. Journal of Reproduction and Fertility Supplement 47:540-541.
46. Nowak, R.M.; Paradiso, J.L. 1983. Walker's mammals of the world, vol. 2. Baltimore, Johns Hopkins Univ. Press. 793pp.
47. Nowell, K.; Jackson, P. (Eds) 1996. Wild cats: status survey and conservation action plan. Gland: IUCN.
48. Oliveira, T.G. 1994. Neotropical cats: ecology and conservation, São Luís, EDUFMA. 221pp.
49. Pantiff, J.A.; Anderson, D.E. 1980. Breeding the margay at New Orleans Zoo. Int. Zoo Yearb. 20:223-224.
50. Petersen, M.K. 1977. Behaviour of the margay. In R.L. Eaton, ed. The world's cats 3(2). Seattle, Carnivore Res. Inst., Univ. Washington, pp. 69-76.
51. Petersen, M.K.; Petersen, M.K. 1978. Growth rates and other post-natal developmental changes in margays. Carnivore 1(1):87-92.
52. Quillen, P. 1981. Hand-rearing the little spotted cat or oncilla (*Felis tigrinus*). Int. Zoo Yearb. 21:240-242.
53. Quillen, P. 1993. Cat Specialist Group: Species Accounts - The Americas - Kodkod (*Oncifelis guigna*). [Online] 14/7/2000. URL <<http://lynx.uio.no/catfolk/guigna01.html>>.



54. Rabinovich, J.; Capurro, A.; Folgarait, P.; Kitzberger, T.; Kramer, G.; Novaro, A.; Puppo, M.; Travaini, A. 1987. Estado del conocimiento de 12 especies de la fauna silvestre Argentina e valor comercial (Knowledge status of 12 species of Argentina wildlife and commercial value). Document presented, for study and discussion, at 2nd workshop: "Elaboración de propuestas de investigación orientada al manejo de la fauna silvestre de valor comercial" (Elaboration of investigation guided proposals to the handling of the wild fauna with commercial value), Buenos Aires.
55. Redford, K.H.; Eisenberg, J.F. 1992. Mammals of the neotropics: the southern cone, vol. 2, Chicago, Univ. Chicago Press, 430pp.
56. Robinson, R. 1970. Inheritance of the black form of the leopard. *Genetics* 41:190.
57. Scheffel, W.; Hemmer, H. 1975. Breeding Geoffroy's cat *Leopardus geoffroyi salinarum* in captivity. *Int. Zoo Yearb.* 15:152-154.
58. Seidensticker, J.; Forthman, D. 1998. Evolution, ecology, and enrichment. In D.J. Shepherdson, J.D. Mellen, & M. Hutchins, ed. *Second Nature - Environmental Enrichment for Captive Animals*. Portland, Smithsonian Institution, pp. 15-29.
59. Simon, F.; Cassaro, K.; Quillen, P. 1997. Small felid breeding project at Sao Paulo Zoo. *International Zoo Yearbook* 35:159-164.
60. Slattery, J.P.; O' Brien S.J. 1998. Patterns of Y and X chromosome DNA sequence divergence during the Felidae radiation. *Genetics* 148:1245-1255.
61. Swanson, W.F.; Morais, R.N.; Moreira, N.; Gomes, M.; Moraes, W.; Brousset, D.; Gallindo, F.; Esquivel, C.; Yarto, E.; Canales, D.; Wasser, S.; Brown, J.L. 1999 Collaborative reproductive research and training programs for the conservation of Latin American felids and primates. *Proceedings 7th World Conference on Breeding Endangered Species in Captivity*. Cincinnati, Ohio, Cincinnati Zoo, p. 262.
62. Swanson, W.F.; Wildt D.E. 1997. Strategies and progress in reproductive research involving small cat species. *International Zoo Yearbook* 35:152-159.
63. Swanson, W.F.; Wolfe, B.A.; Brown, J.L.; Martin-Jimenez, T.; Riviere, J.E.; Roth, T.L.; Wildt, D.E. 1997. Pharmacokinetics and ovarian-stimulatory effects of equine and human chorionic gonadotropins administered singly and in combination in the domestic cat. *Biol. Reprod.* 57:295-302.
64. Tebet JM. 1999. Aspectos clínicos e fisiológicos do ciclo estral da jaguatirica (*Leopardus pardalis*, L. 1758). [Dissertação de Mestrado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista



- "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, *Campus* de Botucatu, SP, Brasil.
65. Widholzer, F.L.; Bergmann, M.; Zotz, C. 1981. Breeding the little spotted cat. *Int. Zoo News* 28:17-22.
66. Wielebnowski, N. 1996. Reassessing the relationship between juvenile mortality and genetic monomorphism in captive cheetahs. *Zoo Biology* 15:353-369.
67. Wielebnowski, N.; Brown, J.L. 1998. Behavioral correlates of physiological estrus in cheetahs. *Zoo Biology* 17:193-209.
68. Wildt, D.E.; Roth, T.L. 1997. Assisted reproduction for managing and conserving threatened felids. *Int. Zoo Yb.* 35:164-172.
69. Wooster, D.S. 1997. Enrichment techniques for small felids at Woodland Park Zoo, Seattle. *International Zoo Yearbook* 35:208-212.
70. Wozencraft, W.C. 1993. Order Carnivora. In D.E. Wilson, & D.M. Reeder, eds. *Mammal species of the world*, 2nd ed. Washington, Smithsonian Institution, pp. 279-348.



III. ANEXOS

- ESPECIFICAÇÕES DO EQUIPAMENTO E MATERIAL:

1. *Ultrasonic cleaner*. METTLER ELECTRONICS.
2. *Corticosterone. ImmuChemTM Double Antibody. ¹²⁵I RIA Kit. For Rats and Mice*. ICN Biomedicals, Inc. Diagnostics Division. 3300 Hyland Avenue. Costa Mesa, CA 92626.
3. COBRATM II AUTO-GAMMA[®] ("Gamma Counter"). Packard Instrument Company, 2200 Warrenville Road, Downers Grove, IL 60515 USA. Service: 1-800-445-7426.
4. Placas de poliestireno ou polivinil cloreto NUNC Maxisorb.
5. *Disposable culture tubes borosilicate glass* - Fisherbrand[®] - Fischer Scientific - Pittsburgh, PA 15219 USA - Catalog No. 14-961-30, Size: 16 X 125 mm (para extração).
6. *Reclosable bags* Minigrip[®] - Minigrip / Zip-Pak. ITW Company - Seguin, Texas 78155 - 3 in X 5 in (para colheita de amostras).
7. *Borosilicate tubes* 12 X 75 mm. Columbia Diagnostics, Inc. - Springfield, Virginia 22153 USA (para ensaios).
8. *Ethyl alcohol, USP dehydrated - 200 proof, flash point 13.5 °C (57 °F)*. McCormick Distilling Co., Inc. - DSP-MO-5 Weston, Missouri 64098 USA (para extrações).
9. *Methanol HPLG grade - UV cutoff 205 nm*. Fisher Chemicals - Fisher Scientific. Fair Lawn, New Jersey 07410 USA.
10. *Shaker bath (Water Bath) MODEL FIFTY*. Precision Scientific Company. Chicago - IL - 60647 USA (para secar os extratos fecais).
11. VECTAIRE[®] FUME HOOD. Hamilton Industries, Inc. - Two Rivers Wisconsin 54241 USA (exaustor para secar amostras).
12. SORVALL[®] RC 3B PLUS. Sorvall[®] Instruments DU PONT (centrífuga refrigerada).
13. BECKMAN[®] LS 5801. *Beta Counter* (novo). Beckman Instruments, Inc. - Fullerton, CA 92634 USA.
14. BECKMAN[®] LS 8000. *Beta Counter* (velho). Beckman Instruments, Inc. - Fullerton, CA 92634 USA. Fax 1-800-643-4366.



15. *Maxi Mix 11* – Thermolyne (“vortex”). Type 37600 Mixer, Model No: M 37615. Barnstead / Thermoline 2555 Kerper Boulevard. Dubuque, Iowa 52001 USA.
16. *Repeater Pipetor and Pipet Tips*. Eppendorf. W. Germany.
17. *Pipets* Eppendorf Research: 20 (0-20 μL), 200 (20-200 μL), 1000 (100-1000 μL).
18. *Pipets* Finnpipette[®] 4500 (40-200 μL). Labsystems.
19. *Permanent* maker. Series No. 30000. Sharpie[®] Fine Point. Sanford[®] USA (caneta marcadora).
20. *ACCUFLEXTM* & *EXPANDEDTM* ICN Biomedicals, Inc. – Diagnostics Division Micromedic Systems (“whomper”).
21. *Sartorius BP 110 S* Max 110 g, d = 0,1 mg. Sartorius Corporation, 131 Heartland Blvd, Edgewood, NY 11717 (balança).



Alimentação dos Animais

Os felídeos utilizados nesses experimentos receberam aproximadamente as seguintes quantidades diárias de alimento, uma vez ao dia, com frequência de sete vezes por semana:

Gato-do-mato-pequeno.....	220 g
Jaguaririca.....	650 g
Gato-maracajá.....	350 g

SUPLEMENTAÇÃO VITAMÍNICA E MINERAL

Os pequenos felídeos receberam suplementação vitamínica e mineral desde fevereiro/95.

A suplementação foi baseada na seguinte proporção:

Carbonato de cálcio	5 g
Fosfato bicálcico.....	10 g
Premix para felinos.....	10 g

Sendo que 25 g desta mistura foram adicionados a cada 2 kg de carne.



A fórmula do *premix** para felinos foi a seguinte:

Vitamina A	3.300.000 UI
Vitamina D	500.000 UI
Vitamina E	30.000 UI
Vitamina B ₁	5.000 mg
Vitamina B ₂	4.000 mg
Niacina	40.000 mg
Ácido pantotênico	5.000 mg
Vitamina B ₆	4.000 mg
Ácido fólico.....	800.000 µg
Biotina	70.000 µg
Vitamina B ₁₂	20.000 µg
Cálcio	0,80 %
Fósforo	0,60 %
Magnésio	0,04 %
Sódio	0,05 %
Potássio	0,40 %
Ferro	80.000 mg
Cobre	5.000 mg
Manganês	5.000 mg
Zinco	50.000 mg
Iodo	300.000 µg
Selênio.....	100.000 µg
Vitamina K	100.000 µg
Vitamina C	30.000 mg
q.s.p.	5.000 g

*OBS.: A suplementação vitamínica e mineral foi fornecida, gratuitamente, pela empresa Nuvital Nutrientes Ltda.



CITOLOGIA VAGINAL

A seguir, é descrita a técnica utilizada para a coloração de Schorr:

COLORAÇÃO DE SCHORR

- a) Fixar a lâmina em álcool etílico 95% durante 10 min. Transferi-la para um recipiente com álcool a 70% (pode ser conservada por tempo indefinido). Uma outra opção é fixar a lâmina a seco com fixador para cabelo em *spray*.
- b) Lavar as lâminas em cuba com água destilada ou água corrente, durante 1 a 5 min. (ou só lavar).
- c) Hematoxilina de Harris - 1 a 3 min. (ou até mais, se estiver fraca).
- d) Água corrente - 5min. (até sair o excesso).
- e) Álcool etílico 95% - 1 min.
- f) Schorr - 7 min. (6 a 10 min.).
- g) Água destilada - mergulhar 15 vezes.
- h) Álcool I (95%) - 1 min.
- i) Álcool II (95%) - 1 min.
- j) Álcool III (95%) - 1 min.
- k) Xilol - 1 min.
- l) Montar a lâmina com bálsamo e lamínula.

OBSERVAÇÕES:

- a) Deve-se proceder a troca do Schorr quando este apresentar a coloração bem avermelhada.
- b) Preparação do bálsamo - 20 ml de xilol com isopor até dar a consistência desejada. Colocar em estufa para retirar o ar.



FÓRMULA DA HEMATOXILINA DE HARRIS

HEMATOXILINA	5,0 g
ÁLCOOL ABSOLUTO.....	50 ml
ALÚMEN DE POTÁSSIO OU AMÔNIA	100 g
ÁGUA DESTILADA	1.000 ml
ÓXIDO VERMELHO DE MERCÚRIO.....	2,5 g

MODO DE PREPARO:

Inicialmente a hematoxilina foi dissolvida no álcool absoluto. O alúmen foi dissolvido na água destilada. Estas soluções foram preparadas e deixadas em repouso durante 24 h.

O alúmen foi fervido em água destilada durante 5 min., com agitação contínua. Após a remoção do balão do fogareiro, a hematoxilina foi acrescentada com cuidado.

O óxido vermelho de mercúrio foi adicionado, e a solução colocada novamente no fogareiro até adquirir a cor púrpura, quando foi retirada imediatamente e esfriada na água. A solução foi filtrada e armazenada em frasco escuro.

OBS.: Pode-se acrescentar 8 ml de ácido acético glacial a 210 ml da hematoxilina pronta.

CORANTE DE SCHORR

A fórmula utilizada foi a seguinte:

<i>Biebrich Scarlet</i> CI 26905.....	50 mg
<i>Orange G</i> WS CI 42755.....	250 mg
<i>Fast Green</i> FCF CI 42053.....	75 mg
Ácido acético glacial	1 ml
Ácido fosfotúngstico	500 mg
Ácido fosfomolibdico.....	500 mg
Álcool 50%.....	100 ml

OBS.: Existe outra metodologia para a coloração de Shorr, cuja técnica é a seguinte:

- a) Fixar em álcool 95% por 15 min a 24 h.
- b) Passar pelo álcool 70% e água corrente.
- c) Corar na hematoxilina de Harris de 30 s a 1 min.
- d) Lavar em água durante 10 min.
- e) Corante de Shorr durante 6 min (esse período pode ser prolongado).
- f) Álcool 95%, 3 passagens; álcool absoluto, 4 passagens; xilol e montar em resina.

A metodologia simplificada para a coloração de Shorr empregada neste trabalho foi a seguinte:

1. Fixação da lâmina com a utilização de um fixador comercial para cabelo.
2. Coloração pelo Corante segundo Shorr (DOLES*) durante 4 a 6 min.
3. A lâmina era mergulhada, com agitação, aproximadamente 10 vezes em cada uma das seguintes soluções:
 - a) Álcool 96° GL.
 - b) Álcool absoluto.
 - c) Álcool absoluto.
 - d) Xilol.
4. Em seguida, era feita a montagem permanente das lâminas com lamínula.